

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
7. September 2001 (07.09.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/64857 A1**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 9/78, (74) Gemeinsamer Vertreter: BASF Aktiengesellschaft;  
C12P 41/00, 7/40, C12N 15/70, 15/76, 15/55 67056 Ludwigshafen (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/02191 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,  
(22) Internationales Anmeldedatum: 27. Februar 2001 (27.02.2001) CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
(25) Einreichungssprache: Deutsch LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,  
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (30) Angaben zur Priorität: 100 10 149,6 3. März 2000 (03.03.2000) DE (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR*),  
von US): BASF Aktiengesellschaft [DE/DE]; 67056 OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,  
Ludwigshafen (DE). MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): RESS-LÖSCHKE, Veröffentlicht:  
Marion [DE/DE]; Ringstrasse 3, 69221 Dossenheim — mit internationalem Recherchenbericht  
(DE). HAUER, Bernhard [DE/DE]; Merowingerstrasse  
1, 67136 Fussgönheim (DE). MATTES, Ralf [DE/DE];  
Friedrich-Zundel-Strasse 14, 70619 Stuttgart (DE).  
ENGELS, Dirk [DE/DE]; Eichenstrasse 13, 72141 Wald-  
dorfhäsloch (DE).  
Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: NITRILASE FROM RHODOCOCCUS RHODOCHROUS NCIMB 11216

(54) Bezeichnung: NITRILASE AUS RHODOCOCCUS RHODOCHROUS NCIMB 11216

(57) Abstract: The invention relates to nucleic acid sequences which code for a polypeptide with nitrilase activity, nucleic acid constructs containing said nucleic acids and vectors containing said nucleic acids or said nucleic acid constructs. The invention also relates to amino acid sequences which are coded by the nucleic acid sequences and micro-organisms containing said nucleic acid sequences, said nucleic acid constructs or vectors containing said nucleic acid sequences or said nucleic acid constructs. The invention also relates to an enzymatic method for producing carboxylic acids from the corresponding nitriles.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Nukleinsäuresequenzen, die für ein Polypeptid mit Nitrilaseaktivität codieren, Nukleinsäurekonstrukte enthaltend die Nukleinsäuresequenzen sowie Vektoren enthaltend die Nukleinsäuresequenzen oder die Nukleinsäurekonstrukte. Die Erfindung betrifft weiterhin Aminosäuresequenzen, die durch die Nukleinsäuresequenzen codiert werden und Mikroorganismen enthaltend die Nukleinsäuresequenzen, die Nukleinsäurekonstrukte oder Vektoren enthaltend die Nukleinsäuresequenzen oder die Nukleinsäurekonstrukte. Außerdem betrifft die Erfindung ein enzymatisches Verfahren zur Herstellung von Carbonsäuren aus den entsprechenden Nitrilen.

WO 01/64857 A1

Nitrilase aus *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216

#### Beschreibung

- 5 Die Erfindung betrifft Nukleinsäuresequenzen, die für ein Polypeptid mit Nitrilaseaktivität codieren, Nukleinsäurekonstrukte enthaltend die Nukleinsäuresequenzen sowie Vektoren enthaltend die Nukleinsäuresequenzen oder die Nukleinsäurekonstrukte. Die
- 10 Erfindung betrifft weiterhin Aminosäuresequenzen, die durch die Nukleinsäuresequenzen codiert werden und Mikroorganismen enthaltend die Nukleinsäuresequenzen, die Nukleinsäurekonstrukte oder Vektoren enthaltend die Nukleinsäuresequenzen oder die Nukleinsäurekonstrukte.
- 15 Außerdem betrifft die Erfindung ein enzymatisches Verfahren zur Herstellung von Carbonsäuren aus den entsprechenden Nitrilen.
- Aliphatische, aromatische und heteroaromatische Carbonsäuren sind
- 20 gesuchte Verbindungen für die organischen Synthesechemie. Sie sind Ausgangsprodukte für eine Vielzahl von pharmazeutischen Wirkstoffen oder Wirkstoffen für den Pflanzenschutz.
- Aus der Literatur sind eine Reihe verschiedener enzymatischer
- 25 Synthesezugänge zu achiralen oder chiralen Carbonsäuren bekannt. So werden beispielsweise optisch aktive Aminosäuren technisch über fermentative Verfahren gewonnen. Von Nachteil dabei ist, daß für jede Aminosäure ein eigenes Verfahren entwickelt werden muß. Um eine möglichst breite Palette verschiedener Verbindungen her-
- 30 stellen zu können, werden deshalb chemische oder enzymatische Verfahren verwendet. Nachteilig bei den chemischen Verfahren ist, daß das Stereozentrum in der Regel in mehrstufigen, nicht breit anwendbaren Synthese umständlich aufgebaut werden muß.
- 35 Die enzymatische Synthese chiraler Carbonsäuren sind einer Reihe von Patenten oder Patentanmeldungen zu entnehmen. WO92/05275 beschreibt die Synthese enantiomerer  $\alpha$ -Hydroxy- $\alpha$ -alkyl- oder  $\alpha$ -Alkylcarbonsäuren in Gegenwart biologischen Materials. Weitere Synthesen zu optisch aktiven  $\alpha$ -substituierten organischen Säuren
- 40 mit Mikroorganismen werden in EP-B-0 348 901, EP-B-0 332 379, EP-A-0 348 901 oder seinem US-Äquivalent US 5,283,193, EP-A-0 449 648, EP-B-0 473 328, EP-B-0 527 553 oder seinem US-Äquivalent US 5,296,373, EP-A-0 610 048, EP-A-0 610 049, EP-A-0 666 320 oder WO 97/32030 beschrieben.
- 45

## 2

Die biotechnologische Synthese achiraler Carbonsäuren mit Mikroorganismen wird beispielsweise in EP-A-0 187 680, EP-A-0 229 042, WO 89/00193, JP 08173152, JP06153968, FR 2694571, EP-A0 502 476, EP-A-0 444 640 oder EP-A-0 319 344 beschrieben.

5

Von Nachteil bei diesen Prozessen ist, daß sie häufig nur zu Produkten mit einer geringen optischen Reinheit führen und/oder daß sie nur mit geringen Raum-Zeit-Ausbeuten ablaufen. Dies führt zu wirtschaftlich unattraktiven Prozessen. Von Nachteil ist

- 10 außerdem, daß die Enzyme, die in den zur Synthese der achiralen oder chiralen Carbonsäuren verwendeten Mikroorganismen vorhanden sind, in der Regel nur ein eingeschränktes Substratspektrum haben, das heißt es werden immer nur bestimmte aliphatische, aromatische oder heteroaromatische Nitrile durch einen Mikro-
- 15 organismus umgesetzt. Speziell aromatische und heteroaromatische Nitrile wie beispielsweise Cyanothiophene oder Benzonitril werden schlecht oder gar nicht zu den entsprechenden Carbonsäuren umgesetzt.

- 20 Es bestand daher die Aufgabe, weitere Enzyme zur Herstellung von achiralen und/oder chiralen Carbonsäuren zu entwickeln, die in einem Verfahren zur Herstellung von achiralen und/oder chiralen Carbonsäuren verwendet werden können, das die oben genannten Nachteile nicht aufweist und speziell aromatische und/oder
- 25 heteroaromatische Carbonsäuren aus den entsprechenden Nitrilen zugänglich macht.

Diese Aufgabe wurde durch die erfindungsgemäße isolierte Nukleinsäuresequenz gelöst, die für ein Polypeptid mit Nitrilase-

- 30 aktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:

a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz,

- 35 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz ableiten,

- c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens 95 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich reduziert
- 40 ist.

45

## 3

- Unter Homologe der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 sind beispielsweise Allelvarianten zu verstehen, die mindestens 95 % Homologie auf der abgeleiteten Aminosäureebene, vorteilhaft mindestens 97 % Homologie, bevorzugt mindestens 98 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 99 % Homologie über den gesamten Sequenzbereich aufweisen. Über Teilbereiche der Sequenzen können die Homologien vorteilhaft höher liegen. Die von SEQ ID NO: 1 abgeleitete Aminosäuresequenz ist SEQ ID NO: 2 zu entnehmen. Allelvarianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei die enzymatische Aktivität der abgeleiteten synthetisierten Proteine für das Einbringen eines oder mehrerer Gene in einen Organismus jedoch erhalten nicht wesentlich reduziert sein sollte. Unter nicht wesentlich reduzierter enzymatische Aktivität ist eine enzymatische Aktivität zu verstehen, die vorteilhaft mindestens 10 %, bevorzugt 30 %, besonders bevorzugt 50 %, ganz besonders bevorzugt 70 % der enzymatischen Aktivität des unter SEQ ID NO: 2 wiedergegebenen Enzyms aufweist. Die Erfindung betrifft damit auch Aminosäuresequenzen, die durch die oben dargestellte Gruppe von Nukleinsäuresequenzen kodiert werden. Vorteilhaft betrifft die Erfindung Aminosäuresequenzen, die durch die Sequenz SEQ ID NO: 1 kodiert werden.
- Weiterhin sind unter Homologe der SEQ ID NO: 1 beispielsweise pilzliche oder bakterielle Homologe, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA oder RNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz zu verstehen. Homologe der SEQ ID NO: 1 besitzen auf DNA-Ebene eine Homologie von mindestens 60 %, bevorzugt von mindestens 70 %, besonders bevorzugt von mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt von mindestens 90 % über den gesamten in SEQ ID NO: 1 angegebenen DNA-Bereich.
- Außerdem sind unter Homologe der SEQ ID NO: 1 Derivate wie beispielsweise Promotorvarianten zu verstehen. Die Promotoren, die den angegebenen Nukleotidsequenzen vorgeschaltet sind, können durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) verändert sein, ohne daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit der Promotoren beeinträchtigt sind. Des weiteren können die Promotoren durch Veränderung ihrer Sequenz in ihrer Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren auch artfremder Organismen ausgetauscht werden.
- Unter Derivaten sind auch Varianten zu verstehen, deren Nukleotidsequenz im Bereich von -1 bis -200 vor dem Startkodon oder 0 bis 1000 Basenpaare nach dem Stopkodon so verändert

wurden, daß die Genexpression und/oder die Proteinexpression verändert, bevorzugt erhöht wird.

Vorteilhaft läßt sich die SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen aus  
5 Bakterien, vorteilhaft aus gram-positiven Bakterien, bevorzugt aus Bakterien der Gattungen Nocardia, Rhodococcus, Streptomyces, Mycobacterium, Corynebacterium, Micrococcus, Proactinomyces oder Bacillus, besonders bevorzugt aus Bakterien der Gattung Rhodococcus, Mycobacterium oder Nocardia, ganz besonders bevorzugt  
10 aus der Gattung und Art Rhodococcus sp., Rhodococcus rhodochrous, Nocardia rhodochrous oder Mycobacterium rhodochrous über dem Fachmann bekannte Methoden isolieren.

SEQ ID No: 1 oder seine Homologen oder Teile dieser Sequenzen  
15 lassen sich beispielsweise mit üblichen Hybridisierungsverfahren oder der PCR-Technik aus anderen Pilzen oder Bakterien isolieren. Diese DNA-Sequenzen hybridisieren unter Standardbedingungen mit den erfindungsgemäßen Sequenzen. Zur Hybridisierung werden vorteilhaft kurze Oligonukleotide der konservierten Bereiche beispielsweise aus dem aktiven Zentrum, die über Vergleiche mit anderen  
20 Nitrilasen oder Nitrilhydratase in dem Fachmann bekannter Weise ermittelt werden können, verwendet. Es können aber auch längere Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder die vollständigen Sequenzen für die Hybridisierung verwendet werden.  
25 Je nach der verwendeten Nukleinsäure Oligonukleotid, längeres Fragment oder vollständige Sequenz oder je nachdem welche Nukleinsäureart DNA oder RNA für die Hybridisierung verwendet werden, variieren diese Standardbedingungen. So liegen beispielsweise die Schmelztemperaturen für DNA:DNA-Hybride ca 10°C  
30 niedriger als die von DNA:RNA-Hybriden gleicher Länge.

Unter Standardbedingungen sind beispielsweise je nach Nukleinsäure Temperaturen zwischen 42 und 58°C in einer wäßrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 bis 5 x SSC (1 x SSC = 0,15 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,2) oder zusätzlich in  
35 Gegenwart von 50 % Formamid wie beispielsweise 42°C in 5 x SSC, 50 % Formamid zu verstehen. Vorteilhafterweise liegen die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen etwa 20°C bis 45°C, bevorzugt zwischen etwa 30°C bis 45°C. Für DNA:RNA-Hybride liegen die Hybridisierungsbedingungen vorteilhaft bei 0,1 x SSC und Temperaturen zwischen  
40 etwa 30°C bis 55°C, bevorzugt zwischen etwa 45°C bis 55°C. Diese angegebenen Temperaturen für die Hybridisierung sind beispielhaft kalkulierte Schmelztemperaturwerte für eine Nukleinsäure mit einer Länge von ca. 100 Nukleotiden und einem G + C-Gehalt von 50 %  
45 in Abwesenheit von Formamid. Die experimentellen Bedingungen für die DNA-Hybridisierung sind in einschlägigen Lehrbüchern der Genetik wie beispielsweise Sambrook et al., "Molecular Cloning",

- Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, beschrieben und lassen sich nach dem Fachmann bekannten Formeln beispielsweise abhängig von der Länge der Nukleinsäuren, der Art der Hybride oder dem G + C-Gehalt berechnen. Weitere Informationen zur Hybridisierung kann
- 5 der Fachmann folgenden Lehrbüchern entnehmen: Ausubel et al. (eds), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular
- 10 Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

- Unter dem erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukt sind die Nitrilasegene der Sequenz SEQ ID NO: 1 und seine Homologen zu
- 15 verstehen, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurden. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure
- 20 regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so daß die natürliche Regulation ausge-
- 25 schaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Nukleinsäurekonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Sequenz SEQ ID NO: 1 oder seine Homologen inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen
- 30 wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, daß keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert wird. Das Nukleinsäurekonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell
- 35 verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nucleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren.
- Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können in einer oder mehreren Kopien im Konstrukt enthalten sein. Im Konstrukt können noch weitere Marker wie Antibiotikaresistenzen oder Auxotrophien
- 40 komplementierende Gene gegebenenfalls zur Selektion auf das Konstrukt enthalten sein.

- Vorteilhafte Regulationssequenzen für das erfindungsgemäße Verfahren sind beispielsweise in Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacIq-, T7-, T5-, T3-,
- 45 gal-, trc-, ara-, SP6-,  $\lambda$ -P<sub>R</sub>- oder im  $\lambda$ -P<sub>L</sub>-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in

## 6

den gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MF $\alpha$ , AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH. In diesem Zusammenhang sind auch die Promotoren der Pyruvat-decarboxylase und der Methanoloxidase aus beispielsweise

5 Hansenula vorteilhaft. Es können auch künstliche Promotoren für die Regulation verwendet werden.

Das Nukleinsäurekonstrukt wird zur Expression in einem Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen Vektor wie beispielsweise

10 einem Plasmid, einem Phagen oder sonstiger DNA inseriert, das eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Diese Vektoren stellen eine weitere Ausgestaltung der Erfindung dar. Geeignete Plasmide sind beispielsweise in E. coli pLG338, pA-CYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236,

15 pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III<sup>113</sup>-B1,  $\lambda$ gt11 oder pBdCI, in Streptomyces pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in Bacillus pUB110, pC194 oder pBD214, in Corynebacterium pSA77 oder pAJ667, in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, in Hefen 2 $\mu$ M, pAG-1, YEpl3 oder pEMBLYe23 oder in Pflanzen pLGV23, pGHIac<sup>+</sup>, pBIN19,

20 pAK2004 oder pDH51. Die genannten Plasmide stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden.

25 Vorteilhafterweise enthält das Nukleinsäurekonstrukt zur Expression der weiteren enthaltenen Gene zusätzlich noch 3' und/oder 5' Terminale regulatorische Sequenzen zur Steigerung der Expression, die je nach ausgewähltem Wirtorganismus und Gen oder Gene für

30 eine optimale Expression ausgewählt werden.

Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst

35 nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder daß es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung

40 der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem

45 beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.



In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann der das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt oder die erfindungsgemäße Nukleinsäure enthaltende Vektor auch vorteilhafterweise in Form einer linearen DNA in die Mikroorganismen eingeführt werden und  
5 über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Vektor wie einem Plasmid oder nur aus dem Nukleinsäurekonstrukt oder der Nukleinsäure bestehen.

- 10 Für eine optimale Expression heterologer Gene in Organismen ist es vorteilhaft die Nukleinsäuresequenzen entsprechend des im Organismus verwendeten spezifischen "codon usage" zu verändern. Der "codon usage" läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene des betreffenden Organismus leicht  
15 ermitteln.

Als Wirtsorganismen für die erfindungsgemäße Nukleinsäure oder dem Nukleinsäurekonstrukt kommen prinzipiell alle prokaryontischen oder eukaryontischen Organismen in Frage. Vorteilhafterweise werden als Wirtsorganismen Mikroorganismen wie Bakterien,  
20 Pilze oder Hefen verwendet. Vorteilhaft werden gram-positive oder gram-negative Bakterien, bevorzugt Bakterien der Familie Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Streptomycetaceae, Mycobacteriaceae oder Nocardiaceae, besonders bevorzugt Bakterien  
25 der Gattungen Escherichia, Pseudomonas, Nocardia, Mycobacterium, Streptomyces oder Rhodococcus verwendet. Ganz besonders bevorzugt sind die Gattung und Art Escherichia coli, Rhodococcus rhodochrous, Nocardia rhodochrous, Mycobacterium rhodochrous oder Streptomyces lividans.

- 30 Der Wirtsorganismus gemäß der Erfindung enthält dabei vorzugsweise mindestens ein proteinisches Agenz zur Faltung der von ihm synthetisierten Polypeptide und insbesondere der in dieser Erfindung beschriebenen Nukleinsäuresequenzen mit Nitrilaseaktivität und/oder die dieses Agenz codierenden Gene, wobei  
35 dieses Agenz in einer Menge vorliegt, die größer ist als die, die der Grundmenge des betrachteten Mikroorganismus entspricht. Die für dieses Agenz codierenden Gene sind im Chromosom oder in extrachromosomalen Elementen wie zum Beispiel Plasmiden  
40 enthalten.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von chiralen oder achiralen Carbonsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man Nitrile in Gegenwart einer durch die  
45 erfindungsgemäßen Nukleinsäuren kodierte Aminosäuresequenz oder einem wachsenden, ruhenden oder aufgeschlossenen oben genannten Mikroorganismus (= Wirtsorganismus), der entweder eine

erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, ein erfindungsgemäßes Nukleinsäurekonstrukt, das eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit einem oder mehreren Regulationssignalen verknüpft enthält, oder einen erfindungsgemäßen Vector enthält, zu den chiralen 5 oder achiralen Carbonsäuren umsetzt.

Ein vorteilhafte Ausführungsform des Verfahrens ist die Umsetzung chiraler oder achiraler aliphatischer Nitrile zu den entsprechenden Carbonsäuren.

10

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens ist ein Verfahren zur Herstellung von chiralen oder achiralen Carbonsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß man Nitrile der allgemeinen Formel I

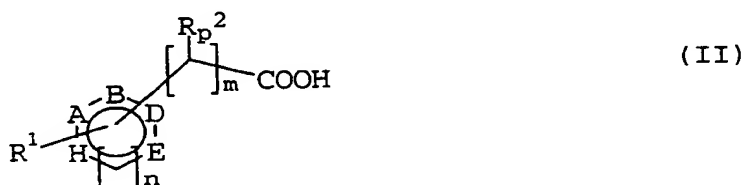
15



20

in Gegenwart einer durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren kodierte Aminosäuresequenz oder einem wachsenden, ruhenden oder aufgeschlossenen oben genannten Mikroorganismus, der entweder 25 eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, ein erfindungsgemäßes Nukleinsäurekonstrukt, das eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit einem oder mehreren Regulationssignalen verknüpft enthält, oder einen erfindungsgemäßen Vector enthält, zu Carbonsäuren der allgemeinen Formel II

30



35

umsetzt,

40 wobei die Substituenten und Variablen in den Formeln I und II folgende Bedeutung haben:

$n = 0$  oder  $1$

45  $m = 0, 1, 2$  oder  $3$ , wobei bei  $m > 2$  zwischen zwei benachbarten Kohlenstoffatomen eine oder keine Doppelbindung vorhanden ist,

p = 0 oder 1

A, B, D und E unabhängig voneinander CH, N oder CR<sup>3</sup>

5 H = O, S, NR<sup>4</sup>, CH oder CR<sup>3</sup>, wenn n = 0, oder CH, N oder CR<sup>3</sup>,  
wenn n = 1,

wobei zwei benachbarte Variablen A, B, D, E oder H zusammen  
einen weiteren substituierten oder unsubstituierten aromatischen,  
10 gesättigten oder teilweise gesättigten Ring mit 5 bis 8 Atomen  
im Ring bilden können, der ein oder mehrere Heteroatome wie O, N  
oder S enthalten kann und wobei nicht mehr als drei der Variablen  
A, B, D, E oder H ein Heteroatom sind,

15 R<sup>1</sup> Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, ver-  
zweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl- oder C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkoxy-,  
substituiertes oder unsubstituiertes Aryl- oder Hetaryl-,  
Hydroxy-, Halogen-, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylamino- oder Amino-,

20 R<sup>2</sup> Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, ver-  
zweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl- oder C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkoxy-,  
substituiertes oder unsubstituiertes Aryl- oder Hetaryl-,  
Hydroxy-, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylamino- oder Amino-,

25 R<sup>3</sup> Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes,  
verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl-, oder  
C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkoxy-, substituiertes oder unsubstituiertes Aryl-,  
Hetaryl-, Hydroxy-, Halogen-, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylamino- oder Amino-,

30 R<sup>4</sup> Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, ver-  
zweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl-.

R<sup>1</sup> bezeichnet in den Verbindungen der Formeln I und II Wasser-  
stoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder  
35 unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl- oder C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkoxy-, substituiertes  
oder unsubstituiertes Aryl- oder Hetaryl-, Hydroxy-, Halogen-  
wie Fluor, Chlor oder Brom, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylamino- oder Amino-.

Als Alkylreste seien substituierte oder unsubstituierte ver-  
40 zweigte oder unverzweigte C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylketten wie beispielsweise  
Methyl, Ethyl, n-Propyl, 1-Methylethyl, n-Butyl, 1-Methylpropyl-,  
2-Methylpropyl, 1,1-Dimethylethyl, n-Pentyl, 1-Methylbutyl,  
2-Methylbutyl, 3-Methylbutyl, 2,2-Dimethylpropyl, 1-Ethylpropyl,  
n-Hexyl, 1,1-Dimethylpropyl, 1,2-Dimethylpropyl, 1-Methylpentyl,  
45 2-Methylpentyl, 3-Methylpentyl, 4-Methylpentyl, 1,1-Dimethyl-  
butyl, 1,2-Dimethylbutyl, 1,3-Dimethylbutyl, 2,2-Dimethylbutyl,  
2,3-Dimethylbutyl, 3,3-Dimethylbutyl, 1-Ethylbutyl, 2-Ethylbutyl,

## 10

1,1,2-Trimethylpropyl, 1,2,2-Trimethylpropyl, 1-Ethyl-1-methylpropyl, 1-Ethyl-2-methylpropyl, n-Heptyl, n-Octyl, n-Nonyl oder n-Decyl genannt. Bevorzugt sind Methyl, Ethyl, n-Propyl, n-Butyl, i-Propyl oder i-Butyl.

5

Als Alkoxyreste seien substituierte oder unsubstituierte, verzweigte oder unverzweigte C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkoxyketten wie beispielsweise Methoxy, Ethoxy, Propoxy, 1-Methylethoxy, Butoxy, 1-Methylpropoxy, 2-Methylpropoxy, 1,1-Dimethylethoxy, Pentoxy, 1-Methyl-

10 butoxy, 2-Methylbutoxy, 3-Methylbutoxy, 1,1-Dimethylpropoxy, 1,2-Dimethylpropoxy, 2,2-Dimethylpropoxy, 1-Ethylpropoxy, Hexoxy, 1-Methylpentoxy, 2-Methylpentoxy, 3-Methylpentoxy, 4-Methylpentoxy, 1,1-Dimethylbutoxy, 1,2-Dimethylbutoxy, 1,3-Dimethylbutoxy, 2,2-Dimethylbutoxy, 2,3-Dimethylbutoxy, 3,3-Dimethyl-

15 butoxy, 1-Ethylbutoxy, 2-Ethylbutoxy, 1,1,2-Trimethylpropoxy, 1,2,2-Trimethylpropoxy, 1-Ethyl-1-methylpropoxy, 1-Ethyl-2-methylpropoxy, Hexyloxy, Heptyloxy, Octyloxy, Nonyloxy oder Decyloxy und deren verzweigt-kettige Homologen genannt.

20 Als Aryl- seien substituiertes und unsubstituiertes Arylreste, die 6 bis 20 Kohlenstoffatome im Ring oder Ringsystem enthalten genannt. Dabei kann es sich um aneinander kondensierte aromatische Ringe handeln oder um aromatische Ringe, die über Alkyl-, Alkylcarbonyl-, Alkenyl- oder Alkenylcarbonylketten, Carbonyl,

25 Sauerstoff oder Stickstoff verbrückt sind. Die Arylreste können gegebenenfalls noch über eine C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Alkenyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-Alkynyl- oder C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Cycloalkylkette an das Grundgerüst gebunden sein. Bevorzugt sind Phenyl oder Naphthyl.

30 Als Hetaryl- seien substituierte oder unsubstituierte, einfache oder kondensierte aromatische Ringsysteme mit einem oder mehreren heteroaromatischen 3- bis 7gliedrigen Ringen, die ein oder mehrere Heteroatome wie N, O oder S enthalten können und gegebenenfalls über eine C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Alkenyl- oder

35 C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Cycloalkylkette an das Grundgerüst gebunden sein können, genannt. Beispiele für derartige Hetarylreste sind Pyrazol, Imidazol, Oxazol, Isooxazol, Thiazol, Triazol, Pyridin, Chinolin, Isochinolin, Acridin, Pyrimidin, Pyridazin, Pyrazin, Phenazin, Purin oder Pteridin. Die Hetarylreste können über die Heteroatome

40 oder über die verschiedenen Kohlenstoffatome im Ring oder Ringsystem oder über die Substituenten an das Grundgerüst gebunden sein. Bevorzugt sind Pyridin, Imidazol, Pyrimidin, Purin, Pyrazin oder Chinolin.

45 Als Alkylaminoreste seien substituierte oder unsubstituierte verzweigte oder unverzweigte C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylaminoketten wie beispielsweise Methylamino, Ethylamino, n-Propylamino, 1-Methylethylamino,

## 11

n-Butylamino, 1-Methylpropylaminoamino-, 2-Methylpropylamino, 1,1-Dimethylethylamino, n-Pentylamino, 1-Methylbutylamino, 2-Methylbutylamino, 3-Methylbutylamino, 2,2-Dimethylpropylamino, 1-Ethylpropylamino, n-Hexylamino, 1,1-Dimethylpropylamino, 5 1,2-Dimethylpropylamino, 1-Methylpentylamino, 2-Methylpentylamino, 3-Methylpentylamino, 4-Methylpentylamino, 1,1-Dimethylbutylamino, 1,2-Dimethylbutylamino, 1,3-Dimethylbutylamino, 2,2-Dimethylbutylamino, 2,3-Dimethylbutylamino, 3,3-Dimethylbutylamino, 1-Ethylbutylamino, 2-Ethylbutylamino, 1,1,2-Tri- 10 methylpropylamino, 1,2,2-Trimethylpropylamino, 1-Ethyl-1-methylpropylamino, 1-Ethyl-2-methylpropylamino, n-Heptylamino, n-Octylamino, n-Nonylamino oder n-Decylamino genannt. Bevorzugt sind Methylamino, Ethylamino, n-Propylamino, n-Butylamino, i-Propylamino oder i-Butylamino.

15

Als Substituenten der genannten Reste von R<sup>1</sup> kommen beispielsweise ein oder mehrere Substituenten wie Halogen wie Fluor, Chlor oder Brom, Thio, Cyano, Nitro, Amino, Hydroxy, Alkyl, Alkoxy, Alkenyl, Alkenyloxy, Alkynyl oder weitere aromatischen oder

20 weitere gesättigte oder ungesättigte nicht aromatische Ringen oder Ringsystemen in Frage. Bevorzugt sind Alkylreste wie C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl wie Methyl, Ethyl, Propyl oder Butyl, Aryl wie Phenyl, Halogen wie Chlor, Fluor oder Brom, Hydroxy oder Amino.

25 R<sup>2</sup> bezeichnet in den Verbindungen der Formeln I und II Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl- oder C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkoxy-, substituiertes oder unsubstituiertes Aryl- oder Hetaryl-, Hydroxy-, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylamino- oder Amino-.

30

Als Alkylreste seien substituierte oder unsubstituierte verzweigte oder unverzweigte C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylketten wie beispielsweise Methyl, Ethyl, n-Propyl, 1-Methylethyl, n-Butyl, 1-Methylpropyl-, 2-Methylpropyl, 1,1-Dimethylethyl, n-Pentyl, 1-Methylbutyl, 35 2-Methylbutyl, 3-Methylbutyl, 2,2-Dimethylpropyl, 1-Ethylpropyl, n-Hexyl, 1,1-Dimethylpropyl, 1,2-Dimethylpropyl, 1-Methylpentyl, 2-Methylpentyl, 3-Methylpentyl, 4-Methylpentyl, 1,1-Dimethylbutyl, 1,2-Dimethylbutyl, 1,3-Dimethylbutyl, 2,2-Dimethylbutyl, 2,3-Dimethylbutyl, 3,3-Dimethylbutyl, 1-Ethylbutyl, 2-Ethylbutyl, 40 1,1,2-Trimethylpropyl, 1,2,2-Trimethylpropyl, 1-Ethyl-1-methylpropyl, 1-Ethyl-2-methylpropyl, n-Heptyl, n-Octyl, n-Nonyl oder n-Decyl genannt. Bevorzugt sind Methyl, Ethyl, n-Propyl, n-Butyl, i-Propyl oder i-Butyl.

45 Als Alkoxyreste seien substituierte oder unsubstituierte, verzweigte oder unverzweigte C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkoxyketten wie beispielsweise Methoxy, Ethoxy, Propoxy, 1-Methylethoxy, Butoxy, 1-Methylprop-

## 12

oxy, 2-Methylpropoxy, 1,1-Dimethylethoxy, Pentoxy, 1-Methylbutoxy, 2-Methylbutoxy, 3-Methylbutoxy, 1,1-Dimethylpropoxy, 1,2-Dimethylpropoxy, 2,2-Dimethylpropoxy, 1-Ethylpropoxy, Hexoxy, 1-Methylpentoxy, 2-Methylpentoxy, 3-Methylpentoxy, 4-Methylpentoxy, 1,1-Dimethylbutoxy, 1,2-Dimethylbutoxy, 1,3-Dimethylbutoxy, 2,2-Dimethylbutoxy, 2,3-Dimethylbutoxy, 3,3-Dimethylbutoxy, 1-Ethylbutoxy, 2-Ethylbutoxy, 1,1,2-Trimethylpropoxy, 1,2,2-Trimethylpropoxy, 1-Ethyl-1-methylpropoxy, 1-Ethyl-2-methylpropoxy, Hexyloxy, Heptyloxy, Octyloxy, Nonyloxy oder Decyloxy und deren verzweigt-kettige Homologen genannt.

Als Aryl- seien substituiertes und unsubstituiertes Arylreste, die 6 bis 20 Kohlenstoffatome im Ring oder Ringsystem enthalten genannt. Dabei kann es sich um aneinander kondensierte aromatische Ringe handeln oder um aromatische Ringe, die über Alkyl-, Alkylcarbonyl-, Alkenyl- oder Alkenylcarbonylketten, Carbonyl, Sauerstoff oder Stickstoff verbrückt sind. Die Arylreste können gegebenenfalls noch über eine C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Alkenyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-Alkinyl- oder C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Cycloalkylkette an das Grundgerüst gebunden sein. Bevorzugt sind Phenyl oder Naphthyl.

Als Hetaryl- seien substituierte oder unsubstituierte, einfache oder kondensierte aromatische Ringsysteme mit einem oder mehreren heteroaromatischen 3- bis 7gliedrigen Ringen, die ein oder mehrere Heteroatome wie N, O oder S enthalten können und gegebenenfalls über eine C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Alkenyl- oder C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Cycloalkylkette an das Grundgerüst gebunden sein können, genannt. Beispiele für derartige Hetarylreste sind Pyrazol, Imidazol, Oxazol, Isooxazol, Thiazol, Triazol, Pyridin, Chinolin, Isochinolin, Acridin, Pyrimidin, Pyridazin, Pyrazin, Phenazin, Purin oder Pteridin. Die Hetarylreste können über die Heteroatome oder über die verschiedenen Kohlenstoffatome im Ring oder Ringsystem oder über die Substituenten an das Grundgerüst gebunden sein. Bevorzugt sind Pyridin, Imidazol, Pyrimidin, Purin, Pyrazin oder Chinolin.

Als Alkylaminoreste seien substituierte oder unsubstituierte verzweigte oder unverzweigte C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylaminoketten wie beispielsweise Methylamino, Ethylamino, n-Propylamino, 1-Methylethylamino, n-Butylamino, 1-Methylpropylaminoamino-, 2-Methylpropylamino, 1,1-Dimethylethylamino, n-Pentylamino, 1-Methylbutylamino, 2-Methylbutylamino, 3-Methylbutylamino, 2,2-Dimethylpropylamino, 1-Ethylpropylamino, n-Hexylamino, 1,1-Dimethylpropylamino, 1,2-Dimethylpropylamino, 1-Methylpentylamino, 2-Methylpentylamino, 3-Methylpentylamino, 4-Methylpentylamino, 1,1-Dimethylbutylamino, 1,2-Dimethylbutylamino, 1,3-Dimethylbutylamino, 2,2-Dimethylbutylamino, 2,3-Dimethylbutylamino, 3,3-Dimethyl-

## 13

butylamino, 1-Ethylbutylamino, 2-Ethylbutylamino, 1,1,2-Tri-methylpropylamino, 1,2,2-Trimethylpropylamino, 1-Ethyl-1-methyl-propylamino, 1-Ethyl-2-methylpropylamino, n-Heptylamino, n-Octyl-amino, n-Nonylamino oder n-Decylamino genannt. Bevorzugt sind  
5 Methylamino, Ethylamino, n-Propylamino, n-Butylamino, i-Propyl-amino oder i-Butylamino.

Als Substituenten der genannten Reste von R<sup>2</sup> kommen beispiels-  
weise ein oder mehrere Substituenten wie Halogen wie Fluor, Chlor  
10 oder Brom, Thio, Nitro, Amino, Hydroxy, Alkyl, Alkoxy, Alkenyl,  
Alkenyloxy, Alkynyl oder weitere aromatischen oder weitere  
gesättigte oder ungesättigte nicht aromatische Ringen oder  
Ringsystemen in Frage. Bevorzugt sind Alkylreste wie C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl  
wie Methyl, Ethyl, Propyl oder Butyl, Aryl wie Phenyl, Halogen  
15 wie Chlor, Fluor oder Brom, Hydroxy oder Amino.

R<sup>3</sup> bezeichnet in den Verbindungen der Formeln I und II Wasser-  
stoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder  
unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl- oder C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkoxy-, substituiertes  
20 oder unsubstituiertes Aryl- oder Hetaryl-, Hydroxy-, Halogen-  
wie Fluor, Chlor oder Brom, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylamino- oder Amino-.

Als Alkylreste seien substituierte oder unsubstituierte ver-  
zweigte oder unverzweigte C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylketten wie beispielsweise  
25 Methyl, Ethyl, n-Propyl, 1-Methylethyl, n-Butyl, 1-Methylpropyl-,  
2-Methylpropyl, 1,1-Dimethylethyl, n-Pentyl, 1-Methylbutyl,  
2-Methylbutyl, 3-Methylbutyl, 2,2-Dimethylpropyl, 1-Ethylpropyl,  
n-Hexyl, 1,1-Dimethylpropyl, 1,2-Dimethylpropyl, 1-Methylpentyl,  
2-Methylpentyl, 3-Methylpentyl, 4-Methylpentyl, 1,1-Dimethyl-  
30 butyl, 1,2-Dimethylbutyl, 1,3-Dimethylbutyl, 2,2-Dimethylbutyl,  
2,3-Dimethylbutyl, 3,3-Dimethylbutyl, 1-Ethylbutyl, 2-Ethylbutyl,  
1,1,2-Trimethylpropyl, 1,2,2-Trimethylpropyl, 1-Ethyl-1-methyl-  
propyl, 1-Ethyl-2-methylpropyl, n-Heptyl, n-Octyl, n-Nonyl oder  
n-Decyl genannt. Bevorzugt sind Methyl, Ethyl, n-Propyl, n-Butyl,  
35 i-Propyl oder i-Butyl.

Als Alkoxyreste seien substituierte oder unsubstituierte, ver-  
zweigte oder unverzweigte C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkoxyketten wie beispielsweise  
Methoxy, Ethoxy, Propoxy, 1-Methylethoxy, Butoxy, 1-Methylpro-  
40 poxy, 2-Methylpropoxy, 1,1-Dimethylethoxy, Pentoxy, 1-Methyl-  
butoxy, 2-Methylbutoxy, 3-Methylbutoxy, 1,1-Dimethylpropoxy,  
1,2-Dimethylpropoxy, 2,2-Dimethylpropoxy, 1-Ethylpropoxy, Hexoxy,  
1-Methylpentoxy, 2-Methylpentoxy, 3-Methylpentoxy, 4-Methylpent-  
oxy, 1,1-Dimethylbutoxy, 1,2-Dimethylbutoxy, 1,3-Dimethylbutoxy,  
45 2,2-Dimethylbutoxy, 2,3-Dimethylbutoxy, 3,3-Dimethylbutoxy,  
1-Ethylbutoxy, 2-Ethylbutoxy, 1,1,2-Trimethylpropoxy, 1,2,2-Tri-  
methylpropoxy, 1-Ethyl-1-methylpropoxy, 1-Ethyl-2-methylpropoxy,

## 14

Hexyloxy, Heptyloxy, Octyloxy, Nonyloxy oder Decyloxy und deren verzweigt-kettige Homologen genannt.

Als Aryl- seien substituiertes und unsubstituiertes Arylreste, 5 die 6 bis 20 Kohlenstoffatome im Ring oder Ringsystem enthalten genannt. Dabei kann es sich um aneinander kondensierte aromatische Ringe handeln oder um aromatische Ringe, die über Alkyl-, Alkylcarbonyl-, Alkenyl- oder Alkenylcarbonylketten, Carbonyl, Sauerstoff oder Stickstoff verbrückt sind. Die Arylreste können 10 gegebenenfalls noch über eine C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Alkenyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-Alkinyl- oder C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Cycloalkylkette an das Grundgerüst gebunden sein. Bevorzugt sind Phenyl oder Naphthyl.

Als Hetaryl- seien substituierte oder unsubstituierte, ein- 15 fache oder kondensierte aromatische Ringsysteme mit einem oder mehreren heteroaromatischen 3- bis 7gliedrigen Ringen, die ein oder mehrere Heteroatome wie N, O oder S enthalten können und gegebenenfalls über eine C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Alkenyl- oder C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-Cycloalkylkette an das Grundgerüst gebunden sein können, 20 genannt. Beispiele für derartige Hetarylreste sind Pyrazol, Imidazol, Oxazol, Isooxazol, Thiazol, Triazol, Pyridin, Chinolin, Isochinolin, Acridin, Pyrimidin, Pyridazin, Pyrazin, Phenazin, Purin oder Pteridin. Die Hetarylreste können über die Heteroatome oder über die verschiedenen Kohlenstoffatome im Ring oder Ring- 25 system oder über die Substituenten an das Grundgerüst gebunden sein. Bevorzugt sind Pyridin, Imidazol, Pyrimidin, Purin, Pyrazin oder Chinolin.

Als Alkylâminoreste seien substituierte oder unsubstituierte ver- 30 zweigte oder unverzweigte C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylaminoketten wie beispielsweise Methylamino, Ethylamino, n-Propylamino, 1-Methylethylamino, n-Butylamino, 1-Methylpropylaminoamino-, 2-Methylpropylamino, 1,1-Dimethylethylamino, n-Pentylamino, 1-Methylbutylamino, 2-Methylbutylamino, 3-Methylbutylamino, 2,2-Dimethylpropylamino, 35 1-Ethylpropylamino, n-Hexylamino, 1,1-Dimethylpropylamino, 1,2-Dimethylpropylamino, 1-Methylpentylamino, 2-Methylpentylamino, 3-Methylpentylamino, 4-Methylpentylamino, 1,1-Dimethylbutylamino, 1,2-Dimethylbutylamino, 1,3-Dimethylbutylamino, 2,2-Dimethylbutylamino, 2,3-Dimethylbutylamino, 3,3-Dimethyl- 40 butylamino, 1-Ethylbutylamino, 2-Ethylbutylamino, 1,1,2-Tri-methylpropylamino, 1,2,2-Trimethylpropylamino, 1-Ethyl-1-methylpropylamino, 1-Ethyl-2-methylpropylamino, n-Heptylamino, n-Octylamino, n-Nonylamino oder n-Decylamino genannt. Bevorzugt sind Methylamino, Ethylamino, n-Propylamino, n-Butylamino, i-Propyl- 45 amino oder i-Butylamino.



## 15

Als Substituenten der genannten Reste von R<sup>3</sup> kommen beispielsweise ein oder mehrere Substituenten wie Halogen wie Fluor, Chlor oder Brom, Thio, Nitro, Amino, Hydroxy, Alkyl, Alkoxy, Alkenyl, Alkenyloxy, Alkynyl oder weitere aromatischen oder weitere

- 5 gesättigte oder ungesättigte nicht aromatische Ringen oder Ringsystemen in Frage. Bevorzugt sind Alkylreste wie C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl wie Methyl, Ethyl, Propyl oder Butyl, Aryl wie Phenyl, Halogen wie Chlor, Fluor oder Brom, Hydroxy oder Amino.
- 10 R<sup>4</sup> bezeichnet in den Verbindungen der Formeln I und II Wasserstoff oder substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl.

Als Alkylreste seien substituierte oder unsubstituierte ver-

- 15 zweigte oder unverzweigte C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylketten wie beispielsweise Methyl, Ethyl, n-Propyl, 1-Methylethyl, n-Butyl, 1-Methylpropyl-, 2-Methylpropyl, 1,1-Dimethylethyl, n-Pentyl, 1-Methylbutyl, 2-Methylbutyl, 3-Methylbutyl, 2,2-Dimethylpropyl, 1-Ethylpropyl, n-Hexyl, 1,1-Dimethylpropyl, 1,2-Dimethylpropyl, 1-Methylpentyl,
- 20 2-Methylpentyl, 3-Methylpentyl, 4-Methylpentyl, 1,1-Dimethylbutyl, 1,2-Dimethylbutyl, 1,3-Dimethylbutyl, 2,2-Dimethylbutyl, 2,3-Dimethylbutyl, 3,3-Dimethylbutyl, 1-Ethylbutyl, 2-Ethylbutyl, 1,1,2-Trimethylpropyl, 1,2,2-Trimethylpropyl, 1-Ethyl-1-methylpropyl, 1-Ethyl-2-methylpropyl, n-Heptyl, n-Octyl, n-Nonyl oder
- 25 n-Decyl genannt. Bevorzugt sind Methyl, Ethyl, n-Propyl, n-Butyl, i-Propyl oder i-Butyl.

Als Substituenten der genannten Reste von R<sup>4</sup> kommen beispielsweise ein oder mehrere Substituenten wie Halogen wie Fluor, Chlor

30 oder Brom, Thio, Nitro, Amino, Hydroxy, Alkyl, Alkoxy, Alkenyl, Alkenyloxy, Alkynyl oder weitere aromatischen oder weitere gesättigte oder ungesättigte nicht aromatische Ringen oder Ringsystemen in Frage. Bevorzugt sind Alkylreste wie C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl wie Methyl, Ethyl, Propyl oder Butyl, Aryl wie Phenyl, Halogen

35 wie Chlor, Fluor oder Brom, Hydroxy oder Amino.

Auch aromatische oder aliphatische gesättigte oder ungesättigte Dinitrile lassen sich im erfindungsgemäßen Verfahren vorteilhaft umsetzen.

## 40

Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorteilhaft bei einem pH-Wert von 4 bis 11, bevorzugt von 4 bis 9 durchgeführt.

Weiterhin werden im Verfahren vorteilhaft von 0,01 bis 10 Gew.-%, 45 bevorzugt 0,1 bis 10 Gew.-%, besonders bevorzugt 0,5 bis 5 Gew.-% Nitril verwendet. Je nach Nitril können unterschiedliche Mengen an Nitril in der Reaktion verwendet werden. Die geringsten Mengen

## 16

an Nitril werden vorteilhaft bei Nitrilen (Cyanhydrine) verwendet (= Mengen zwischen 0,01 bis 5 Gew.-%), die im Gleichgewicht mit den entsprechenden Aldehyden und Blausäure stehen. Da der Aldehyd für die Mikroorganismen oder Enzyme in der Regel toxisch ist.

- 5 Nitrile, die leicht flüchtig sind, werden ebenfalls vorteilhaft in Mengen zwischen 0,01 bis 5 Gew.-% eingesetzt. Bei höheren Cyanhydrin- bzw. Nitrilmengen läuft die Reaktion verzögert ab. Bei Nitrilen, die nur geringe oder nahezu keine Lösungsmittel-eigenschaften haben oder Nitrilen, die sich nur in sehr geringen
- 10 Mengen in wäßrigen Medium lösen, können vorteilhaft auch größere als die oben angegebenen Mengen eingesetzt werden. Zur Erhöhung des Umsatzes und der Ausbeute wird die Reaktion vorteilhafterweise unter kontinuierlicher Zugabe des Nitrils durchgeführt. Das Produkt kann nach Ende der Reaktion isoliert werden oder
- 15 aber in einem Bypass kontinuierlich entfernt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird vorteilhaft bei einer Temperatur zwischen 0°C bis 80°C, bevorzugt zwischen 10°C bis 60°C, besonders bevorzugt zwischen 15°C bis 50°C durchgeführt

20

Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren aromatische oder heteroaromatische Nitrile wie 2-Phenyl-propionitril, 2-Hydroxy-phenylelessigsäurenitril, 2-Amino-2-phenyl-acetonitril, Benzonitril, Phenylacetonitril, trans-Zimtsäurenitril, 3-Cyan-

25 thiophen oder 3-Cyanomethyl-thiophen genannt.

Unter chiralen Nitrilen im erfindungsgemäßen Verfahren sind Nitrile zu verstehen, die aus einem 50:50 Gemisch der beiden Enantiomere oder aus einem beliebigen anderen Gemisch mit einer

- 30 Anreicherung eines der beiden Enantiomere im Gemisch bestehen. Beispielhaft seien für derartige Nitrile 2-Phenyl-propionitril, 2-Hydroxy-phenylelessigsäurenitril, 2-Amino-2-phenyl-acetonitril, 2-Chlor-propionitril oder 2-Hydroxy-propionitril genannt.

- 35 Unter chiralen Carbonsäuren sind im erfindungsgemäßen Verfahren zu verstehen, die eine Enantiomerenanreicherung zeigen. Bevorzugt werden im Verfahren Enantiomerenreinheiten von mindestens 90 %ee, bevorzugt von min. 95 %ee, besonders bevorzugt von min. 98 %ee, ganz besonders bevorzugt min. 99 %ee erreicht.

40

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Umsetzung einer großen Vielzahl von chiralen oder achiralen Nitrilen zu den entsprechenden chiralen oder achiralen Carbonsäuren. Im Verfahren lassen sich mindestens 25 mmol Nitril/h x mg Protein oder min-

- 45 destens 25 mmol Nitril/h x g Trockengewicht der Mikroorganismen umsetzen, bevorzugt mindestens 30 mmol Nitril/h x mg Protein oder mindestens 30 mmol Nitril/h x g Trockengewicht, besonders bevor-

## 17

zugt mindestens 40 mmol Nitril/h x mg Protein oder mindestens 40 mmol Nitril/h x g Trockengewicht, ganz besonders bevorzugt mindestens 50 mmol Nitril/h x mg Protein oder mindestens 50 mmol Nitril/h x g Trockengewicht.

5

Für das erfindungsgemäße Verfahren können wachsende Zellen verwendet werden, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, Nukleinsäurekonstrukte oder Vektoren enthalten. Auch ruhende oder aufgeschlossene Zellen können verwendet werden. Unter auf-

- 10 geschlossenen Zellen sind beispielsweise Zellen zu verstehen, die über eine Behandlung mit beispielsweise Lösungsmitteln durchlässig gemacht worden sind, oder Zellen die über eine Enzymbehandlung, über eine mechanische Behandlung (z.B. French Press oder Ultraschall) oder über eine sonstige Methode auf-
- 15 gebrochen wurden. Die so erhaltenen Rohextrakte sind für das erfindungsgemäße Verfahren vorteilhaft geeignet. Auch gereinigte oder angereinigte Enzyme können für das Verfahren verwendet werden. Ebenfalls geeignet sind immobilisierte Mikroorganismen oder Enzyme, die vorteilhaft in der Reaktion Anwendung finden
- 20 können.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten chiralen oder achiralen Carbonsäuren lassen sich vorteilhaft aus der wäßrigen Reaktionslösung über Extraktion oder Kristallisation oder über

25 Extraktion und Kristallisation gewinnen. Hierzu wird die wäßrige Reaktionslösung mit einer Säure wie einer Mineralsäure (z.B. HCl oder H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) oder einer organischen Säure angesäuert vorteilhaft auf pH-Werte unter 2 und anschließend mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert. Die Extraktion kann zur Erhöhung der

- 30 Ausbeute mehrfach wiederholt werden. Als organische Lösungsmittel können prinzipiell alle Lösungsmittel verwendet werden, die mit Wasser gegebenenfalls nach Zugabe von Salzen eine Phasengrenze zeigen. Vorteilhafte Lösungsmittel sind Lösungsmittel wie Toluol, Benzol, Hexan, Methyltertiärbutylether oder Essigester. Auch
- 35 eine Reinigung der Produkte kann auch vorteilhaft über Bindung an einen Ionentauscher und anschließendes eluieren mit einer Mineralsäure oder Carbonsäure wie HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Ameisensäure oder Essigsäure erfolgen.

- 40 Nach Einengen der wässrigen oder organischen Phase können die Produkte in der Regel in guten chemischen Reinheiten, das heißt größer 90 % chemische Reinheit, gewonnen werden. Nach Extraktion kann die organische Phase mit dem Produkt aber auch nur zum Teil eingeeengt werden und das Produkt auskristallisiert werden. Dazu
- 45 wird die Lösung vorteilhaft auf eine Temperatur von 0°C bis 10°C abgekühlt. Die Kristallisation kann auch direkt aus der organischen Lösung erfolgen. Das auskristallisierte Produkt kann

## 18

nochmals in im gleichen oder in einem anderen Lösungsmittel zur erneuten Kristallisation aufgenommen werden und nochmals kristallisiert werden. Durch die anschließende mindestens einmalige Kristallisation kann die Enantiomerenreinheit des Produktes je nach Lage des Eutektikum weiter gesteigert werden.

Die chiralen oder achiralen Carbonsäuren können jedoch auch direkt nach Ansäuern mit einer Säure auf einen pH-Wert vorteilhaft unter 2 aus der wäßrigen Reaktionslösung auskristallisiert werden. Vorteilhaft wird dazu die wäßrige Lösung unter Erwärmen eingeeengt und in ihrem Volumen um 10 bis 90 %, bevorzugt 20 bis 80 %, besonders bevorzugt 30 bis 70 % reduziert. Vorzugsweise wird die Kristallisation unter Kühlung durchgeführt. Temperaturen zwischen 0°C bis 10°C sind für die Kristallisation bevorzugt. Aus kostengründen ist die direkte Kristallisation aus der wäßrigen Lösung bevorzugt. Ebenfalls bevorzugt wird eine Aufarbeitung der chiralen Carbonsäuren über eine Extraktion und gegebenenfalls anschließender Kristallisation.

Bei diesen bevorzugten Aufarbeitungsarten läßt sich das Produkt des erfindungsgemäßen Verfahrens in Ausbeuten von 60 bis 100 %, bevorzugt von 80 bis 100 %, besonders bevorzugt von 90 bis 100 % bezogen auf das für die Reaktion eingesetzte Nitril isolieren. Das isolierte Produkt zeichnet sich durch eine hohe chemische Reinheit von > 90 %, bevorzugt > 95 % besonders bevorzugt von > 98 % aus. Weiterhin zeichnen sich die Produkte bei chiralen Nitrilen bzw. chiralen Carbonsäuren durch eine hohe Enantiomerenreinheit, die durch die Kristallisation weiter gesteigert werden kann.

Die so gewonnenen Produkte eignen sich als Ausgangsmaterial für organischen Synthesen zur Herstellung von Pharmaka oder Agrochemikalien oder zur Racematspaltung.

## 35 Beispiele:

Isolierung und heterologe Expression des *nitA*-Gens aus *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216

40 Beispiel 1: Isolierung des *nitA*-Gens aus *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216

Zur Isolierung des *nitA*-Gens aus *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216 wurde zelleigene DNA isoliert, eine Phagen-Genbank angelegt und diese mit einer Oligo-Nukleotid-Sonde durchsucht.

## 19

1.1 Isolierung von DNA aus *R.rhodochrous* NCIMB 11216

- Zur Präparation genomischer DNA aus *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216 nach Sambrook et al., 1989, wurden 2 x 100 ml Über-
- 5 nacht-Kultur (in dYT-Medium, Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.) abzentrifugiert und die Pellets in 8 ml 25 mM Tris/HCl, 25 mM EDTA, 10 % Saccharose (w/v), pH 8,0 resuspendiert.
- 10 Nach Lysozymbehandlung der vereinigten Kulturen für 15 min bei 37°C (Zugabe von 2 ml Lysozym, 100 mg/ml in 10 mM Tris/HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) wurden 2 ml 10 % (w/v) Na-Lauroylsarcosinat zuge-
- geben und bei mehrmaliger Durchmischung 15 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde CsCl in einer Endkonzentration von 1 g/ml hin-
- 15 zugegeben, bei 65°C gelöst und nach Zugabe von Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,4 mg/ml eine Ultrazentrifugation im Festwinkelrotor (Sorvall T1270, 83500 g, 48 h, 17°C) durchgeführt. Die chromosomale DNA-Bande wurde unter UV-Licht abgezogen, 2 h gegen TE 10.1 (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) dialysiert
- 20 und 3 mal mit Phenollösung (gesättigt mit 10 mM Tris/HCl, pH 8) extrahiert. Schließlich wurde die DNA noch 3 mal gegen TE 10.01 (10 mM Tris/HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0), dialysiert und bei 4°C gelagert. So wurden etwa 1,5 ml DNA-Lösung mit einer Konzentration von etwa 500 µg/ml gewonnen.

25

1.2 Herstellung einer Phagen-Genbank aus der DNA von *R.rhodochrous* NCIMB 11216

- Als Vektor für die Genbank wurde der Phage  $\lambda$ ±RESIII verwendet:
- 30 Dieser Substitutionsvektor enthält das lux-Operon als Replacement-Fragment, was eine visuelle Erfassung des Hintergrundes durch Biolumineszenz ermöglicht, sowie integrierte res ("resolution") -sites aus Tn1721 und die Replikationsfunktionen von pTW601-1, so daß der Vektor in einem Stamm mit entsprechender
- 35 Transposase in ein autonom replizierendes Plasmid umgewandelt werden kann (Altenbuchner, 1993, A new  $\lambda$  RES vector with a built-in Tn1721-encoded, excision system, Gene 123, 63-68).

1.2.1 Isolierung von  $\lambda$ ±RESIII-DNA (nach Sambrook et al., 1989)

40

- Aus einer Übernachtskultur von *E.coli* TAP 90 (LB<sub>0</sub>, Sambrook et al., 1989, mit 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,2 % Maltose (w/v)) wurden 10<sup>10</sup> Zellen abzentrifugiert und das Pellet in 3 ml SM-Phagenpuffer (50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,01 % (w/v) Gelatine)
- 45 resuspendiert. Nach Infektion mit 1,5 x 10<sup>8</sup> - 1,5 x 10<sup>9</sup> plaque forming units (pfu)  $\lambda$  RESIII-Phagenlysate für 20 min bei 37°C wurde der Ansatz im 2 l Erlenmeyer-Kolben zu 500 ml LB<sub>0</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>,

## 20

0,2 % Maltose gegeben. Insgesamt 4 solcher Ansätze wurden  
9 bis 12 h bei 37°C gerührt, bis die Zellyse erkennbar wurde. Zur  
vollständigen Lyse wurde jeder Kolben mit 10 ml Chloroform ver-  
setzt, weitere 30 min bei 37°C gerührt. Zelluläre Nukleinsäuren  
5 wurden durch Zugabe von DNase und RNase (je 1 µg/ml) 30 min bei  
Raumtemperatur unter Rühren verdaut. Dann wurden zu jedem Ansatz  
29,2 g NaCl zugegeben, gelöst, 10 min bei 8300 g zentrifugiert  
und die Überstände mit 10 % PEG 6000 versetzt. Zur anschließenden  
Phagenpräzipitation wurden die Ansätze über Nacht bei 4°C ge-  
10 rührt und anschließend 15 min bei 14000 g abzentrifugiert. Nach  
Trocknen der Pellets wurden diese in jeweils 5 ml SM-Puffer  
aufgenommen, mit 5 ml Chloroform versetzt und 15 min bei 3000 g  
zentrifugiert. Die wässrigen Phasen mit den Phagen wurden ver-  
einigt, mit 0,75 g/ml CsCl versetzt und nach vollständiger Lösung  
15 24 h zentrifugiert (Festwinkelrotor Sorvall T1270, 98400 g, 48 h,  
17°C). Die sichtbare Phagenbande wurde abgezogen und 2 x gegen  
50 mM Tris/HCl, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,0 dialysiert. Nach  
Zugabe von 20 mM EDTA, 50 µg/ml Proteinase K und 0,5 % SDS er-  
folgte eine Inkubation für 1 h bei 65°C. Anschließend wurde je 1 x  
20 mit Phenol (gesättigt mit 10 mM Tris/HCl, pH 8), 1 x mit Phenol  
(gesättigt mit 10 mM Tris/HCl, pH 8) / Chloroform (50/50 v/v) und  
1 x mit Chloroform extrahiert. Schließlich wurde die DNA 3 x  
gegen TE 10.1 und 1 x gegen TE 10.01 dialysiert, der Titer auf  
E.coli TAP 90 bestimmt (siehe 1.2.3) und die λ±RESIII-DNA bei 4°C  
25 gelagert.

## 1.2.2 Klonierung genomischer DNA in λ±RESIII-Vektoren

Für die Klonierung genomischer *R. rhodochrous* NCIMB 11216 DNA-  
30 Fragmente wurden zuerst die λ±RESIII-Armfragmente präpariert, in-  
dem λ±RESIII-DNA in einem Volumen von 100 µl 2 µg mit 20 U *Bam*HI  
5 h bei 37°C verdaut wurden. Nach Extraktion mit Phenol (gesättigt  
mit 10 mM Tris/HCl, pH 8) / Chloroform (50/50 v/v), Isopropanol-  
Fällung und Waschen mit 70 % bzw. 100 % Äthanol (vorgekühlt auf  
35 -20°C) wurde die DNA in TE 10.01 gelöst und mit 20 U *Sal*I nach-  
behandelt (5 h bei 37°C). Erneut erfolgten Phenol / Chloroform-  
Extraktion, Isopropanol-Fällung, Waschen und Lösung in TE 10.01.

Zur Herstellung der genomischen DNA-Fragmente wurden - nach Auf-  
40 nahme einer Zeitkinetik für die verwendete Enzymcharge - 10 µg  
genomische DNA in einem 100 µl-Ansatz für 5 min mit 0,5 U *Sau*3AI  
partial verdaut. Nach elektrophoretischer Auftrennung über ein  
0,8 %iges Low-melting-point-Agarosegel wurde der Fragmentbereich  
von 8 bis 14 kb isoliert und nach Parker & Seed (1980) aus dem  
45 Gel eluiert. Die genomischen DNA-Fragmente wurden über Nacht bei  
16°C mit den λ±RESIII-Armen ligiert.

## 21

Die Ligationsansätze wurden schließlich *in vitro* mit Phagenextrakten verpackt, die zuvor aus dem "packaging extract donor" *E.coli* BHB 2688 ("freeze thaw lysate", FTL, Sambrook et al., 1989) und dem "prehead donor" *E.coli* BHB 2690 ("sonicated extract", SE, Sambrook et al., 1989) präpariert worden waren. Für die Verpackung wurden 5 µl Ligationsansatz, 7 µl Puffer A (20 mM Tris/HCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0,05 % β-Mercaptoäthanol, pH 8,0), 7 µl Puffer M1 (6,7 mM Tris/HCl, 33 mM Spermidin, 100 mM Putrescin, 17,8 mM ATP, 0,2 % β-Mercaptoäthanol, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8), 15 µl SE und 10 µl FTL gemischt und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 500 µl SM-Puffer und 1 Tropfen Chloroform zugegeben, gemischt, die Ansätze abzentrifugiert und bei 4°C gelagert.

15 Zur Titerbestimmung der hergestellten Phagengenbank wurde der Stamm *E.coli* TAP 90 (Patterson & Dean, 1987) infiziert. Hierzu wurden logarithmisch wachsende Zellen (Anzucht in LB<sub>0</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 % Maltose) mit 100 µl verschiedener Verdünnungen des Verpackungs- oder Phagenlysats in SM-Puffer für 30 min bei 20 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden dann mit je 3 ml auf 42°C temperierten Top-Agar (0,8 % Bacto-Agar, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 % Maltose) versetzt, kurz gemischt und auf LB<sub>0</sub>-Agarplatten mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> (auf 37°C vorgewärmt) aufgeschichtet. Nach 12-16 h Inkubation bei 37°C wurden die Plaques zur Titerbestimmung aus- 25 gezählt. Der Titer der hergestellten Genbank betrug etwa 4 x 10<sup>5</sup> pfu/ml.

### 1.2.3 Umwandlung der rekombinanten λ<sup>+</sup>RESIII-Phagen in ein Plasmid

30

Die erhaltenen rekombinanten λ<sup>+</sup>RESIII-Phagen wurden in dem Stamm *E.coli* HB 101 F' [::Tn1739lac], der das Transposon Tn1739 mit dem Resolvasegen unter Kontrolle des *tac*-Promotors trägt (Altenbuchner, 1993, siehe oben), in ein autonom replizierendes Plasmid 35 umgewandelt. Dieser Stamm wurde zur Infektion in 5 ml LB<sub>0</sub> mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,5 % Maltose bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 angezogen und 100 µl davon mit einer geeigneten Menge an Phagenlysats für 30 min bei Raumtemperatur infiziert. Der Ansatz wurde in 5 ml vorgewärmtem dYT, 1 mM Isopropyl-β-thiogalactopyranosid 40 (IPTG) 1 h bei 37°C gerollert, abzentrifugiert, im Rücklauf resuspendiert, und die Zellen auf dYT Agarplatten mit 100 µg/ml Kanamycin plattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zur Visualisierung von Zellen, deren umgewandeltes λ<sup>+</sup>RESIII-Molekül noch das ursprüngliche Replacement-Fragment mit dem lux-Operon und somit kein genomisches Insert enthält (Genbank-hintergrund), wurden die Platten 3 h bei 30°C induziert und die

## 22

bioluminiszierenden Zellen im Dunkeln ausgezählt. Der Genbank-hintergrund betrug dem Anteil leuchtender Zellen zufolge 13 %.

1.3. Screening des Nitrilasegens *nitA* aus *R.rhodochrous*  
5 NCIMB 11216

Rekombinante  $\lambda$ RESIII-Phagen, die chromosomale DNA-Fragmente mit dem Nitrilasegen aus *R.rhodochrous* NCIMB 11216 enthalten, wurden durch Hybridisierung der Phagenplaques mit der Oligo-Nukleotid-

10 Sonde

"nit1lower", mit der Sequenz: 5'-TGGAA(AG)TG(CT)TCCCA(AG)CA-3',

Kobayashi, M., Komeda, H., Yanaka, N., Nagasawa, T. and

15 Yamada, H. (1992)

Nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* J1.

Kobayashi, M., Izui, H., Nagasawa, T. and Yamada, H. (1993)

Nitrilase in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic  
20 acid from indole-3-acetonitrile: Cloning of the *Alcaligenes* gene  
and site-directed mutagenesis of cysteine residues.

identifiziert. Die Sequenz des Oligo-Nukleotids wurde aus einem konservierten Aminosäuresequenzbereich mit dem mutmaßlichen

25 katalytischen Cystein-Rest (Kobayashi et al., J. Biol. Chem. 267, 1992, 20746-20751 und Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 1993, 247-251). Dieses Motif konnte auch in den bereits bekannten DNA-

Sequenzen der Nitrilasegene aus den Stämmen *Rhodococcus rhodochrous* J1 (GenBank Acc. # D11425) und *R.rhodochrous* K22 (GenBank

30 Acc. # D12583) gefunden werden.

1.3.1 Transfer von DNA und Hybridisierung

Auf 5 Agarplatten mit insgesamt 2500 Plaques, die wie für die  
35 Titerbestimmung in 1.2.3 beschrieben hergestellt wurden, wurden Nylon-Rundmembranen für 1 min aufgelegt. Die Membranen wurden 2 x 5 min mit der Plaque-Seite nach oben auf Filterpapier mit Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) und dann 2 x 5 min auf Filterpapier mit Neutralisierungslösung (0,5 M Tris/HCl,  
40 1,5 M NaCl, pH 7,5) gelegt. Anschließend wurden sie kurz in 50 mM NaCl gewaschen, getrocknet und die DNA über 30 min bei 120°C fixiert.

Zur Hybridisierung wurden die Membranen mit 50 ml Hybridisierungspuffer für 2 h bei 37°C präinkubiert und dann über Nacht in

45 12 ml Hybridisierungspuffer bei 37°C mit 10 pmol <sup>32</sup>P-markiertem Oligo-Nukleotid hybridisiert. Das Oligo-Nukleotid wurde in einem 30 µl-Ansatz mit 80 µCi (γ-<sup>32</sup>P)-ATP durch 10 U T4-Polynukleotid-



kinase markiert und über eine Tropfsäulen-Gelfiltration mit Sephadex G-25 von überschüssigem ( $\gamma$ - $^{32}$ P)-ATP getrennt.

Nach der Hybridisierung wurden die Nylonmembranen 1 x 5 min bei Raumtemperatur mit 0,5 g/l NaCl, 8,8 g/l Na-Citrat (2 x SSC), 0,1 % SDS und 2 x 15 min bei 32°C mit 0,125 g/l NaCl, 2,2 g/l Na-Citrat (0,5 x SSC), 0,1 % SDS gewaschen und für 5 Tage in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie mit einem Röntgenfilm exponiert.

10

### 1.3.2 Identifizierung und Sequenzierung des *nitA*-Gens

Es wurden insgesamt 3 positive Klone identifiziert, von denen zwei ein unvollständiges *nitA*-Genfragment und einer das vollständige *nitA*-Gen trug. Die positiven Plaques wurden ausgestochen, 2 h bei Raumtemperatur in je 0,5 ml SM-Puffer inkubiert und nach Zugabe von 2 Tropfen Chloroform bei 4°C gelagert. Das nach Umwandlung des rekombinanten  $\lambda$ RESIII Phagen mit dem vollständigen *nitA*-Gen resultierende Plasmid (siehe 1.2.3) wurde mit pDHE 6 bezeichnet (Fig. 1 gibt pDHE 6 mit 12 kb genomischen Genbankfragment von *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216 wieder) und die Umgebung des *nitA*-Gens mit Hilfe von Southern-Hybridisierungen mit der Oligo-Nukleotid-Sonde "nitllower" restriktionskartiert. Ein 1,5 kb *PvuI*-Fragment mit dem gesamten *nitA*-Gen wurde mit Klenow-Fragment behandelt und in *EcoRV* behandelten pBluescriptSK+ subkloniert (pDHE 7 mit dem 1,5 kb *PvuI*-Fragment aus dem genomischen 12 kb Genbankfragment von *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216 in pDHE 6, Fig. 2). Nach weiterer Subklonierung der überlappenden pDHE 7-Fragmente *HindIII* (Vektor) /*EcoRI*, *KpnI/XhoI*, *EcoRV/BamHI* und *ApaI/EcoRI* (Vektor) in jeweils entsprechend verdauten pBluescriptSK+ wurde das *PvuI*-Fragment nach der Methode von Sanger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1977, 5463-5467) mit Hilfe eines automatischen Sequenziergerätes doppelsträngig sequenziert. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit einem kommerziell erhältlichen Sequenzierkit mit den ebenfalls kommerziell erhältlichen "universal"- und "reverse"-Primern (Vieira & Messing, Gene, 19, 1982: 259 - 268) durchgeführt. Die für das 1,5 kb *PvuI*-Fragment ermittelte DNA-Sequenz ist in SEQ ID NO: 1 wiedergegeben. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist SEQ ID NO: 2 zu entnehmen.

- 2 Heterologe Expression des *nitA*-Gens aus *R. rhodochrous* NCIMB 11216 in *E. coli* und Reinigung des rekombinanten Nitrilase-Proteins
- 5 Zur Klonierung in einen Expressionsvektor wurde das *nitA*-Gen aus *R. rhodochrous* NCIMB 11216 vom Translations-Start- bis zum Translations-Stop-Codon amplifiziert. Hierzu wurden die Primer "nit NdeI" (upper) mit der Sequenz:
- 10 5'-TATATATCATATGGTCGAATACACAAACA-3'
- und
- "nit HindIII" (lower) mit der Sequenz:
- 15 5'-TAATTAAGCTTCAGAGGGTGGCTGTCGC-3'
- verwendet, in denen an das 5'-*nitA*-Ende eine mit dem Translationsstart überlappende NdeI-Schnittstelle und an das 3'-*nitA*-
- 20 Ende eine mit dem Stopcodon überlappende HindIII-Schnittstelle angefügt ist. Mit diesem Primerpaar wurde das *nitA*-Gen aus pDHE 7 mit der Pwo-Polymerase in 40 µl Reaktionsvolumen mit je 8 pmol Primer, 100 pg pDHE 7-Template und 2,5 Units Pwo in 10 mM Tris-HCl, pH 8.85, 25 mM KCl, 5 mM (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,2 mM dATP,
- 25 0,2 mM dTTP, 0,2 mM dGTP und 0,2 mM dCTP unter den folgenden Bedingungen amplifiziert:
- Denaturierung für 3' bei 94°C;
- 30 25 Zyklen mit Denaturierung für 1' bei 93°C, Primeranlagerung für 1' 30'' bei 48°C und Polymerisation für 1' 30'' bei 72°;
- Abschluß-Polymerisation für 5' bei 72°C.
- 35 Das erhaltene *nit*-PCR-Fragment wurde gereinigt, mit NdeI/HindIII verdaut, in analog verdaute Vektormoleküle pJOE 2702 (Volff et al., Mol. Microbiol., 21, 1996: 1037 - 1047) integriert und das resultierende Plasmid mit pDHE 17 (Fig. 2: pDHE 17 mit *nitA* in dem L-Rhamnose-induzierbaren Expressionsvektor pJOE 2702)
- 40 bezeichnet. Durch die Integration über NdeI/HindIII steht das *nitA*-Gen in dem Plasmid pDHE 17 unter Transskriptionskontrolle des in pJOE 2702 enthaltenen Promotors *rha<sub>p</sub>*, der aus dem L-Rhamnose-Operon *rhaBAD* in *E. coli* (Egan & Schleif, Mol. Biol. 243, 1994: 821 - 829) stammt. Die Transkriptions-Termination
- 45 des *nitA*-Gens und die Translations-Initiation der Transkripte erfolgen ebenfalls über Vektorsequenzen (Volff et al., 1996). Nach Transformation von pDHE 17 in *E. coli* JM 109 ist das *nitA*-Gen

## 25

aus *R. rhodochrous* NCIMB 11216 durch Zugabe von L-Rhamnose induzierbar.

Zur Reinigung des rekombinanten Nitrilase-Proteins über Imidazol-  
5 Affinitätschromatographie wurde das *nitA*-Gen außerdem mit einer  
3'-Sequenz für ein C-terminales His<sub>6</sub>-Motiv fusioniert, indem für  
die Amplifikation des *nitA*-Gens, die unter den oben genannten  
Bedingungen erfolgte, neben dem 5'-Primer "nitNdeI" (upper)  
ein modifizierter 3'-Primer ohne Stop-Codon mit der Sequenz  
10 5'-CGAGGGTGGCTGTCGCCCCG-3' verwendet wurde und das erhaltene  
PCR-Fragment in einen modifizierten pJOE 2702-Vektor integriert  
wurde, der hinter der *Bam*HI-Schnittstelle die Sequenz [CAT]<sub>6</sub>TGA  
enthielt. Nach *Bam*HI-Verdau, Klenow-Behandlung und *Nde*I-Verdau  
des Vektors wurde das *Nde*I-nachgeschnittene *nitA*-Pwo-Amplifikat  
15 so durch Ligation am 3'-Ende durch "blunt ends" im Leserahmen  
mit der His<sub>6</sub>-Motiv-Sequenz fusioniert und das erhaltene Plasmid  
mit pDHE 18 bezeichnet.

Zur heterologen Expression im Labormaßstab wurde JM 109 (pDHE 17)  
20 aus einer 37°C Übernachtskultur 1:200 in 50 ml dYT-Vollmedium  
(Sambrook et al., 1989) mit 0,2 % L-Rhamnose angeimpft und die  
Kultur für 8 h bei 30°C im Schüttelwasserbad unter Induktion  
kultiviert. Anschließend wurden die Zellen einmal in 50 mM Tris/  
HCl, pH 7,5 gewaschen, entsprechend einer OD<sub>600</sub> von 10 in dem-  
25 selben Puffer resuspendiert und durch Ultraschall-Behandlung auf-  
geschlossen. Mit JM 109 (pDHE 18) wurde in analoger Weise ver-  
fahren. Das Proteinmuster der durch Ultraschallbehandlung er-  
haltenen, über Zentrifugation geklärten Rohextrakte im Vergleich  
zur nicht-induzierten Kontrolle wurde durch SDS-Polyacrylamid-  
30 Gelelektrophorese ermittelt; nach den genannten Induktions-  
bedingungen betrug der Nitrilase-Anteil am Gesamtprotein für  
JM 109 (pDHE 17) und JM 109 (pDHE 18) je etwa 30 %.

Zur Reinigung der Nitrilase mit His<sub>6</sub>-Motiv aus JM 109 (pDHE 18)  
35 wurden die Zellen in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 gewaschen, ent-  
sprechend etwa 50 OD<sub>600</sub>/ml resuspendiert und Extrakte mit einer  
French-Press (2 x bei 20000 psi) hergestellt. Nach Klärung der  
Extrakte durch Zentrifugation für 30 min bei 15000 g erfolgte  
die Reinigung über QIAexpress-Ni<sup>2+</sup>-NTA (QIAGEN). Pro ml Rohextrakt  
40 wurde 1 ml Matrix verwendet, die mit 20 mM Tris/HCl, pH 7,5  
äquilibriert wurde. Nach dem Beladen der Säule wurde mit  
5 Säulenvolumina 20 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 40 mM Imidazol,  
pH 7,0 gewaschen und mit 20 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 300 mM  
Imidazol, pH 7,5 eluiert. Die gelelektrophoretische Reinheit des  
45 so gewonnenen Nitrilaseproteins war > 90 %. Nach zweimaliger

## 26

Dialyse gegen 50 mM Tris/HCl, 0,1 mM DTT, 0,5 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pH 7,5 konnte die gereinigte Nitrilase bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert werden.

Für die Rohextrakte wurden für den Umsatz von 2-Benzonitril zu  
5 Benzoessäure jeweils um 2 U/mg und für die über QIAexpress-Ni<sup>2+</sup>-NTA gereinigte Nitrilase mit His<sub>6</sub>-Motiv bei einer Enzymkonzentration von 50 µg/ml um 11 U/mg ermittelt. 1 Unit entspricht dabei der Produktion von 1 µmol Benzoessäure bei einer anfänglichen Benzonitrilkonzentration von 10 mM, 30°C und pH 7,5. Die Umsätze von  
10 2-Benzonitril zu Benzoessäure durch den Nitrilase-Rohextrakt erfolgten in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, die Umsätze mit gereinigter Nitrilase in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 0,1 mM DTT. Die Benzoessäure-Bildung wurde mittels HPLC (Säule RP18, 250 x 4, Laufmittel 47 % Methanol, 0,3 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,) bestimmt.

15 Analog dem oben beschriebenen Beispiel wurden eine Reihe von Nitrilen umgesetzt und die erzielten Umsätze bestimmt.

Mit den E. coli-Stämmen JM 109 (pDHE 17 bzw. pDHE 18) wurden  
20 verschiedene Nitrile umgesetzt. Die Zellen wurden dazu in 250 ml LB/Amp-Medium + 2 g/l Rhamnose bei 30°C und 200 upm für 9 Stunden (= h) angezogen. Die Zellernte erfolgt durch Zentrifugation (20 min, 4°C, 5000 rpm). Die Zellen wurden anschließend in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,2 resuspendiert, so daß die Konzentration an  
25 Biotrockenmasse (BTM) bei 2 g BTM/l lag. Je 150 µl der Zellsuspension wurden pro well in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte wurde anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellpellets zweimal mit  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1,42 g/l in Finnaqua, pH 7,2) gewaschen. Nach erneutem Zentrifugations-  
30 schritt, werden die Zellpellets in der jeweiligen Substratlösung (150 µl) resuspendiert. Je eine 12-er Reihe der Mikrotiterplatte wurde mit einem Substrat versetzt. Als Kontrolle wurde eine Reihe mit der Substratlösung ohne Zellen genommen (Leerwert-Blank). Die Mikrotiterplatten wurden bei 30°C und 200 rpm für 1 h im Schüttel-  
35 inkubator inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und im Überstand die entstandene Menge an  $\text{NH}_4$ -Ionen mit Hilfe des Biomek-Geräts bestimmt. Die Messung erfolgte bei 620 nm gegen eine Eichkurve, die mit verschiedenen  $\text{NH}_4\text{OH}$ -Lösungen erstellt worden war. Als Substrate wurden in Experiment 1 (siehe Figur 3,  
40 Tabelle 1) folgende Substrate eingesetzt: Benzonitril (=1), 3-Hydroxypropionitril (=2), 2-Methylglutaronitril (=3), 4-Chlor-3-hydroxybutyronitril (=4), Malonodinitril (=5), Crotononitril (=6), Geranonitril (=7), Octandisäuredinitril (=8), Pivalonitril (=9), Aminocapronitril (=10), 3,4-Dihydroxybenzo-  
45 nitril (=11), 3,5-Dibrom-4-hydroxybenzonitril (=12), 3-Cyanpyridin (=13), 4-Brombenzylcyanid (=14), 4-Chlorbenzylcyanid (=15), 2-Phenylbutyronitril (=16), 2-Chlorbenzylcyanid (=17),

## 27

2-Pyridylacetonitril (=18), 4-Fluorbenzylcyanid (=19), 4-Methylbenzonitril (=20), Benzylcyanid (=21). In Experiment 2 (siehe Figur 4, Tabelle 2), das analog zu Experiment 1 durchgeführt wurde, wurden folgende Substrate verwendet: 2-Phenylpropionitril (=1), Mandelonitril (=2), 2-Amino-2-phenylacetonitril (=3), 2-Hydroxypropionitril (=4), 3,3-Dimethoxypropionitril (=5), 3-Cyanthiophen (=6), 3-Cyanmethylthiophen (=7), Benzonitril (=8), Propionitril (=9), trans-Zimtsäurenitril (=10), 2-Hydroxy-4-phenylbutyronitril (=11), 3-Phenylglutarsäuredinitril (=12), Fumaronitril (=13), Glutaronitril (=14) Valeronitril (=15).

Tabelle 1

15	1	Benzonitril	0,4051
	2	3-Hydroxypropionitril	0,1785
	3	2-Methylglutaronitril	0,4758
	4	4-Chlor-3-hydroxybutyronitril	0,1208
	5	Malonodinitril	0,1208
20	6	Crotononitril	0,4946
	7	Geranonitril	0,1517
	8	Octandisäuredinitril	0,4548
	9	Pivalonitril	0,1569
	10	Aminocapronitril	0,1236
25	11	3,4-Dihydroxybenzonitril	0,1569
	12	3,5-Dibrom-4-hydroxybenzonitril	0,1624
	13	3-Cyanpyridin	0,2393
	14	4-Brombenzylcyanid	0,5213
	15	4-Chlorbenzylcyanid	0,4830
30	16	2-Phenylbutyronitril	0,1376
	17	2-Chlorbenzylcyanid	0,4530
	18	2-Pyridylacetonitril	0,1222
	19	4-Fluorbenzylcyanid	0,2361
	20	4-Methylbenzonitril	0,4326
35	21	Benzylcyanid	0,2755

40

45

Tabelle 2

5	1	2-Phenylpropionitril	0,0000
	2	Mandelonitril	0,0000
	3	2-Amino-2-phenylacetonitril	0,0000
	4	2-Hydroxypropionitril	0,0000
	5	3,3-Dimethoxypropionitril	0,1466
10	6	3-Cyanothiophen	1,9038
	7	3-Cyanomethylthiophen	0,9949
	8	Benzonitril	1,9518
	9	Propionitril	0,4135
	10	trans-Zimsäurenitril	2,2509
15	11	2-Hydroxy-4-phenylbutyronitril	0,0000
	12	3-Phenylglutarsäuredinitril	0,0000
	13	Fumaronitril	2,2510
	14	Glutaronitril	2,0809
	15	Valeronitril	1,9218

25

30

35

40

45

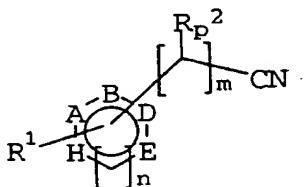
## Patentansprüche

1. Isolierte Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit  
5 Nitrilaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe:
  - a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1  
dargestellten Sequenz,
  - 10 b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des  
degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 1  
dargestellten Nukleinsäuresequenz ableiten,
  - 15 c) Derivate der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäure-  
sequenz, die für Polypeptide mit der in SEQ ID NO: 2  
dargestellten Aminosäuresequenzen codieren und mindestens  
95 % Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß  
die enzymatische Wirkung der Polypeptide wesentlich  
20 reduziert ist.
2. Aminosäuresequenz codiert durch eine Nukleinsäuresequenz  
gemäß Anspruch 1.
3. Aminosäuresequenz nach Anspruch 2, codiert durch die in  
25 SEQ ID NO: 1 dargestellte Sequenz.
4. Nukleinsäurekonstrukt enthaltend eine Nukleinsäuresequenz  
gemäß Anspruch 1, wobei die Nukleinsäuresequenz mit einem  
oder mehreren Regulationssignalen verknüpft ist.
- 30 5. Vector enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 1  
oder ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß Anspruch 4.
6. Rekombinanten Mikroorganismus enthaltend eine Nukleinsäure-  
35 sequenz gemäß Anspruch 1, ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß  
Anspruch 4 oder einen Vector gemäß Anspruch 5.
7. Rekombinanten Mikroorganismus nach Anspruch 6, wobei es  
sich bei dem Mikroorganismus um ein Bakterium der Gattungen  
40 Escherichia, Rhodococcus, Nocardia, Streptomyces oder  
Mycobacterium handelt.
8. Verfahren zur Herstellung von chiralen oder achiralen Carbon-  
säuren, dadurch gekennzeichnet, daß man Nitrile in Gegenwart  
45 einer Aminosäuresequenz gemäß Anspruch 2 oder 3 oder einem  
wachsenden, ruhenden oder aufgeschlossenen Mikroorganismus

gemäß Anspruch 6 oder 7 zu den chiralen oder achiralen Carbonsäuren umgesetzt.

9. Verfahren zur Herstellung von chiralen oder achiralen Carbonsäuren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man Nitrile der allgemeinen Formel I

10

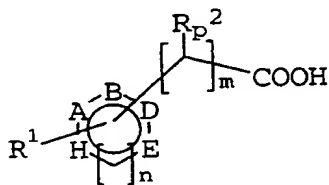


(I),

15

in Gegenwart einer Aminosäuresequenz gemäß Anspruch 2 oder 3 oder einem wachsenden, ruhenden oder aufgeschlossenen Mikroorganismus gemäß Anspruch 6 oder 7 zu Carbonsäuren der allgemeinen Formel II

20



(II)

25

umsetzt,

30

wobei die Substituenten und Variablen in den Formeln I und II folgende Bedeutung haben:

$n = 0$  oder  $1$

35

$m = 0, 1, 2$  oder  $3$ , wobei bei  $m > 2$  zwischen zwei benachbarten Kohlenstoffatomen eine oder keine Doppelbindung vorhanden ist,

$p = 0$  oder  $1$

40

A, B, D und E unabhängig voneinander CH, N oder CR<sup>3</sup>

H = O, S, NR<sup>4</sup>, CH oder CR<sup>3</sup>, wenn  $n = 0$ , oder CH, N oder CR<sup>3</sup>, wenn  $n = 1$ ,

45

wobei zwei benachbarte Variablen A, B, D, E oder H zusammen einen weiteren substituierten oder unsubstituierten aromatischen, gesättigten oder teilweise gesättigten Ring mit 5 bis 8 Atomen im Ring bilden können, der ein oder mehrere Hetero-

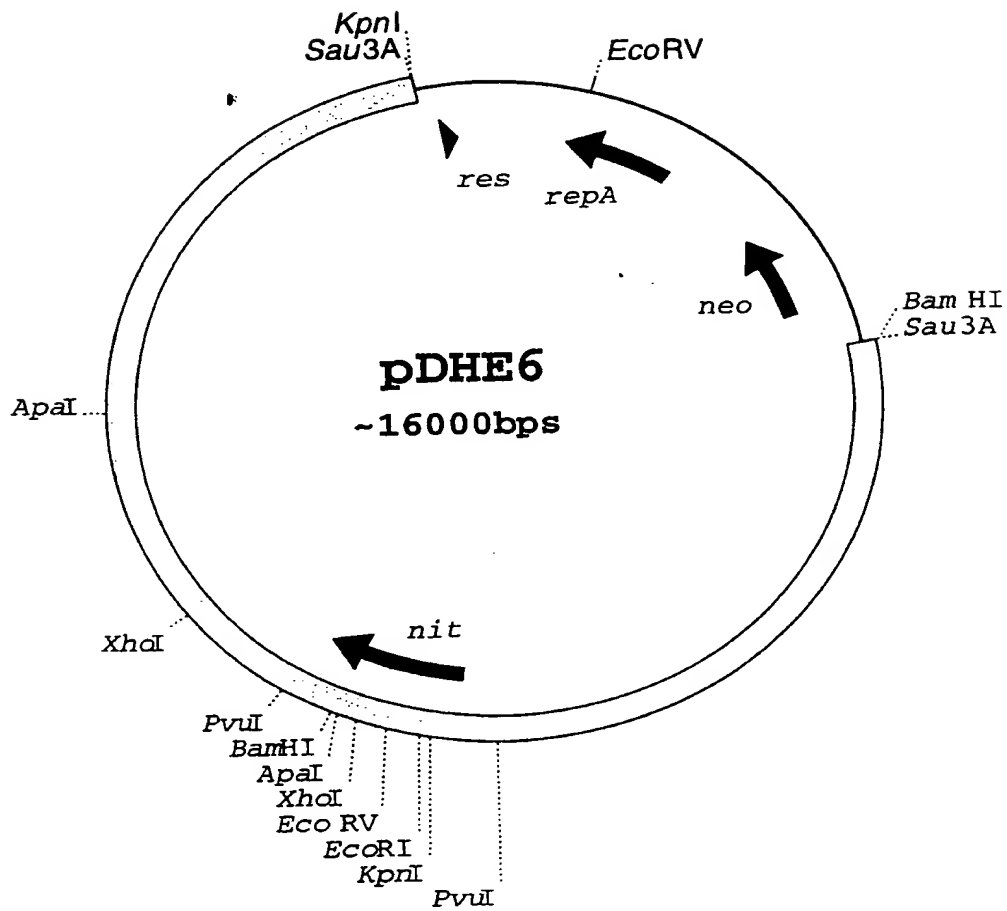


## 31

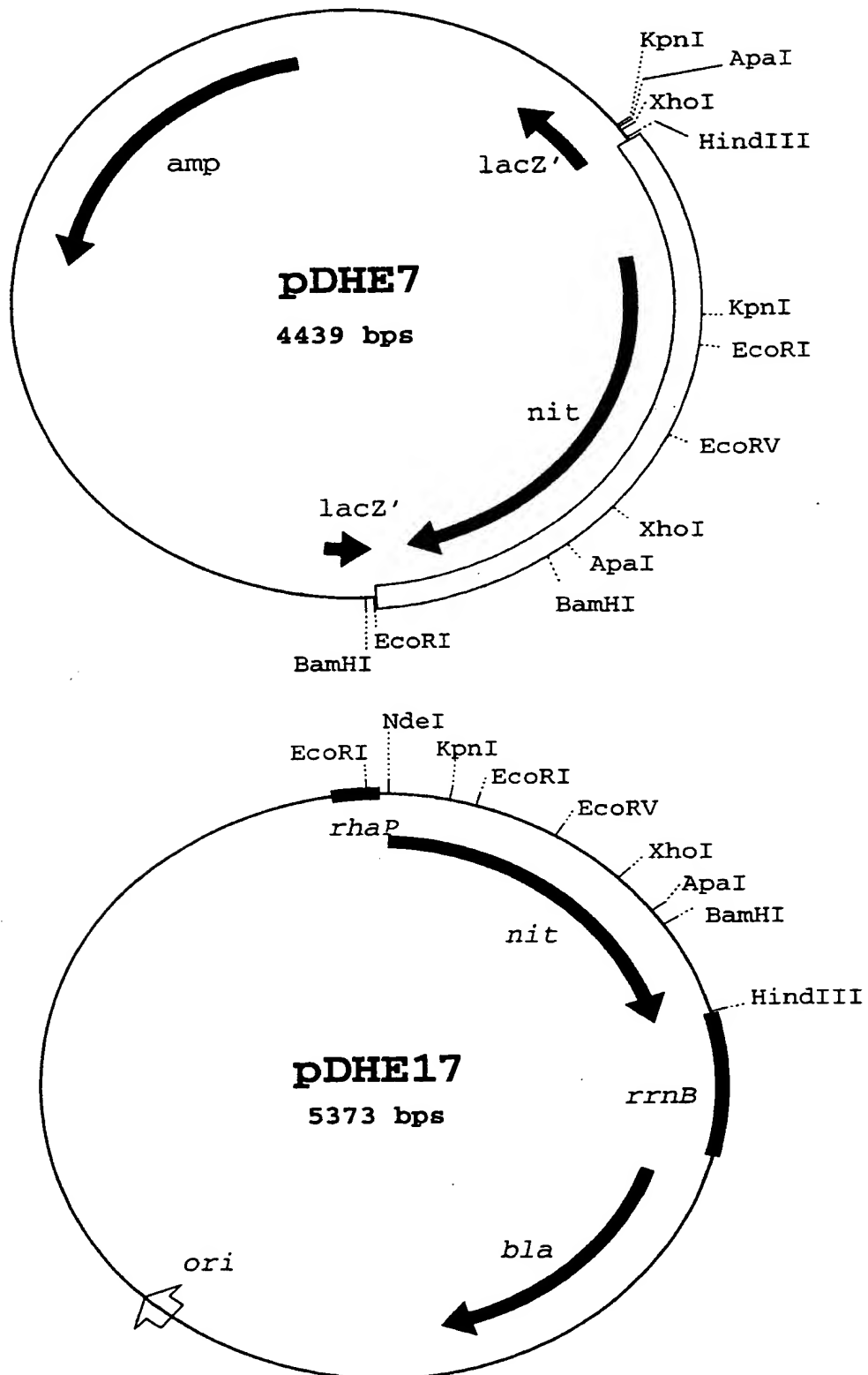
atome wie O, N oder S enthalten kann und wobei nicht mehr als drei der Variablen A, B, D, E oder H ein Heteroatom sind,

- 5 R<sup>1</sup> Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl- oder C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkoxy-, substituiertes oder unsubstituiertes Aryl- oder Hetaryl-, Hydroxy-, Halogen-, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl-amino- oder Amino-,
- 10 R<sup>2</sup> Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl- oder C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkoxy-, substituiertes oder unsubstituiertes Aryl- oder Hetaryl-, Hydroxy-, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylamino- oder Amino-,
- 15 R<sup>3</sup> Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl-, oder C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkoxy-, substituiertes oder unsubstituiertes Aryl-, Hetaryl-, Hydroxy-, Halogen-, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylamino- oder Amino-,
- 20 R<sup>4</sup> Wasserstoff, substituiertes oder unsubstituiertes, verzweigtes oder unverzweigtes C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-Alkyl-.
- 25 10. Verfahren nach den Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren in wäßriger Reaktionslösung bei einem pH zwischen 4 bis 11 durchgeführt wird.
- 30 11. Verfahren nach den Ansprüchen 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß im Verfahren 0,01 bis 10 Gew-% Nitril umgesetzt werden.
- 35 12. Verfahren nach den Ansprüchen 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren bei einer Temperatur zwischen 0°C bis 80°C durchgeführt wird.
- 40 13. Verfahren nach den Ansprüchen 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die achirale oder chirale Carbonsäure über Extraktion oder Kristallisation oder Extraktion und Kristallisation in Ausbeuten von 60 bis 100 % aus der Reaktionslösung gewonnen wird.

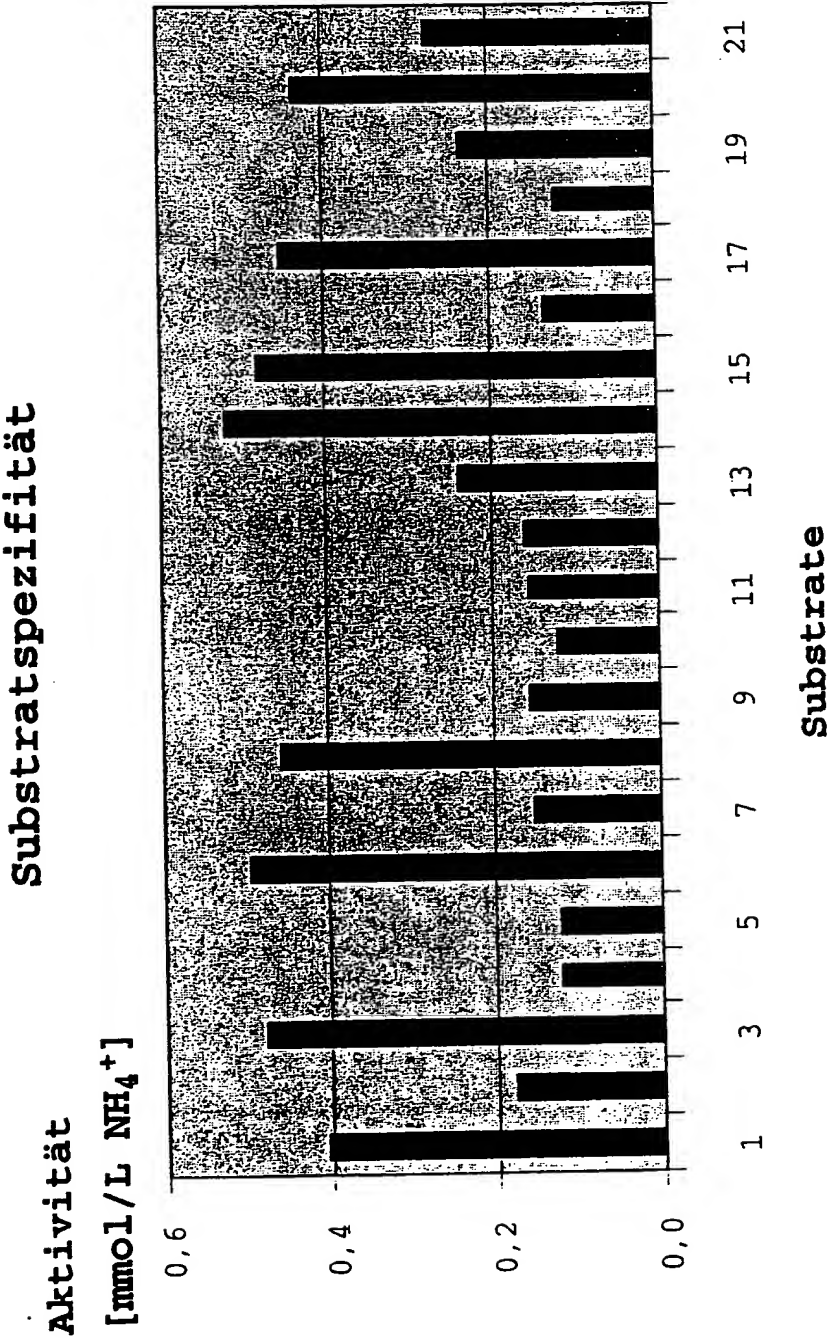
Figur 1: Plasmidkarte von pDHE6



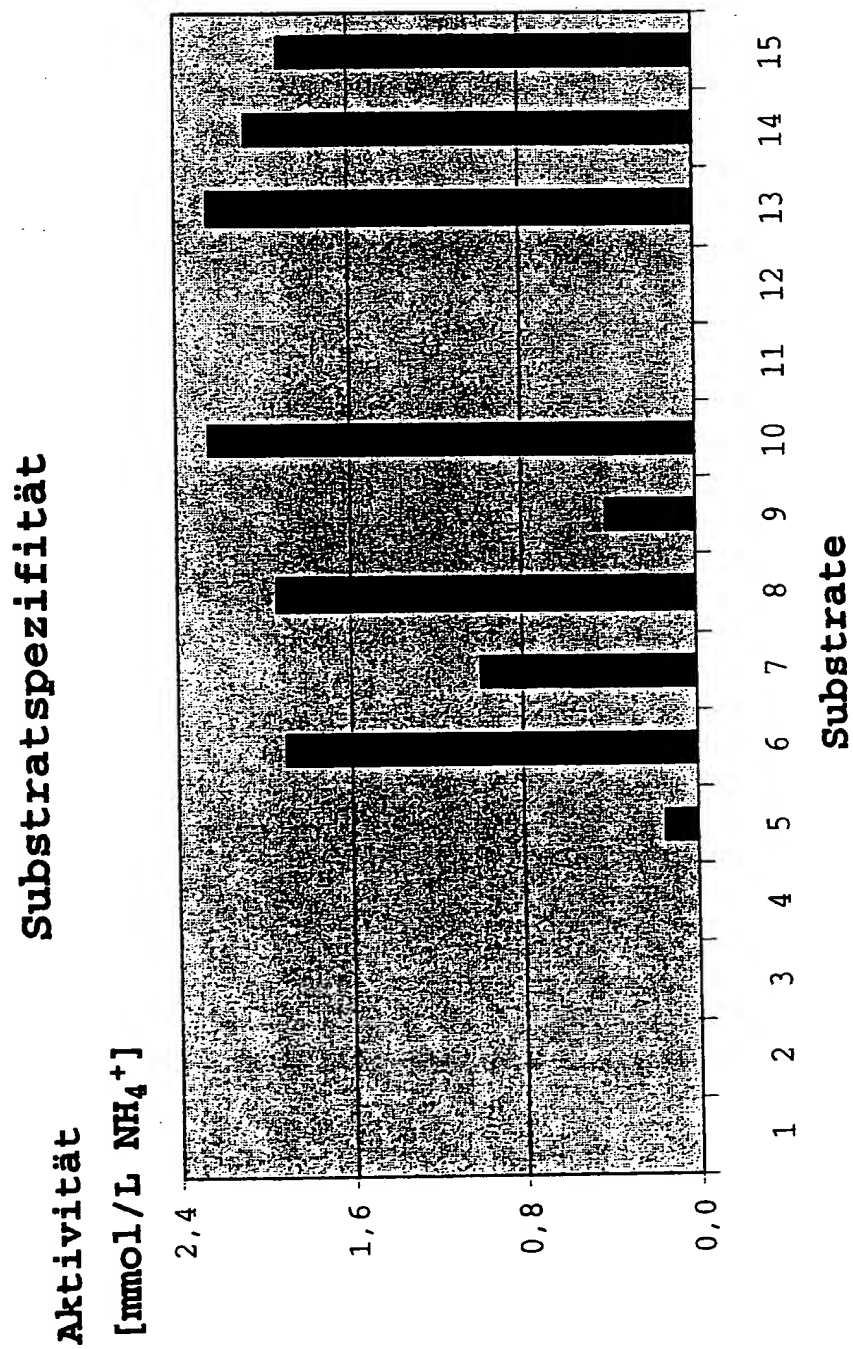
Figur 2: Plasmidkarten von pDHE7 und pDHE17



Figur 3



Figur 4



## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rhodococcus rhodochrous

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (286) .. (1386)

&lt;400&gt; 1

```

cgatcgaacc agcaacgggg acgcacagtc gacgtagacc tcgacctatc cgccggttcg 60
cagaaggaca cggaccacca ccacttcaac atccttcaac gtgcccggcc agtccttcga 120
cgaatcgaaa cggcgaagag ccgcctcgga cccccggcc gaaccgctcg atgaactccc 180
ctacacgggt ggcgcagaat gccaggaccc gtgtcattec acgtcaattc acgcgccttt 240
tcacctcgta ctgtcctgcc aaacacaagc aacggaggta cggac atg gtc gaa tac 297
                                         Met Val Glu Tyr
                                         1

aca aac aca ttc aaa gtt gct gcg gtg cag gca cag cct gtg tgg ttc 345
Thr Asn Thr Phe Lys Val Ala Ala Val Gln Ala Gln Pro Val Trp Phe
   5              10              15              20

gac gcg gcc aaa acg gtc gac aag acc gtg tcc atc atc gcg gaa gca 393
Asp Ala Ala Lys Thr Val Asp Lys Thr Val Ser Ile Ile Ala Glu Ala
          25              30              35

gcc cgg aac ggg tgc gag ctc gtt gcg ttt ccc gag gta ttc atc ccg 441
Ala Arg Asn Gly Cys Glu Leu Val Ala Phe Pro Glu Val Phe Ile Pro
          40              45              50

ggg tac ccg tac cac atc tgg gtc gac agc ccg ctc gcc gga atg gcg 489
Gly Tyr Pro Tyr His Ile Trp Val Asp Ser Pro Leu Ala Gly Met Ala
          55              60              65

aag ttc gcc gtg cgc tac cac gag aat tcc ctg acg atg gac agc ccg 537
Lys Phe Ala Val Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Thr Met Asp Ser Pro
          70              75              80

cac gta cag cgg ttg ctc gat gcc gcc cgc gac cac aac atc gcc gta 585
His Val Gln Arg Leu Leu Asp Ala Ala Arg Asp His Asn Ile Ala Val
          85              90              95              100

gtg gtg gga atc agc gag cgg gat ggc ggc agc ttg tac atg acc cag 633
Val Val Gly Ile Ser Glu Arg Asp Gly Gly Ser Leu Tyr Met Thr Gln
          105              110              115

ctc atc atc gac gcc gat ggg caa ctg gtc gcc cga cgc cgc aag ctc 681
Leu Ile Ile Asp Ala Asp Gly Gln Leu Val Ala Arg Arg Arg Lys Leu

```

2

120	125	130	
aag ccc acc cac gtc gag cgt	tcg gta tac gga gaa gga aac ggc tcg	729	
Lys Pro Thr His Val Glu Arg	Ser Val Tyr Gly Glu Gly Asn Gly Ser		
135	140 145		
gat atc tcc gtg tac gac atg cct ttc gca cgg ctt ggc gcg ctc aac	777		
Asp Ile Ser Val Tyr Asp Met Pro Phe Ala Arg Leu Gly Ala Leu Asn			
150	155 160		
tgc tgg gag cat ttc cag acg ctc acc aag tac gca atg tac tcg atg	825		
Cys Trp Glu His Phe Gln Thr Leu Thr Lys Tyr Ala Met Tyr Ser Met			
165	170 175 180		
cac gag cag gtg cac gtc gcg agc tgg cct ggc atg tcg ctg tac cag	873		
His Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Gly Met Ser Leu Tyr Gln			
185	190 195		
ccg gag gtc ccc gca ttc ggt gtc gat gcc cag ctc acg gcc acg cgt	921		
Pro Glu Val Pro Ala Phe Gly Val Asp Ala Gln Leu Thr Ala Thr Arg			
200	205 210		
atg tac gca ctc gag gga caa acc ttc gtg gtc tgc acc acc cag gtg	969		
Met Tyr Ala Leu Glu Gly Gln Thr Phe Val Val Cys Thr Thr Gln Val			
215	220 225		
gtc aca ccg gag gcc cac gag ttc ttc tgc gag aac gag gaa cag cga	1017		
Val Thr Pro Glu Ala His Glu Phe Phe Cys Glu Asn Glu Glu Gln Arg			
230	235 240		
aag ttg atc ggc cga ggc gga ggt ttc gcg cgc atc atc ggg ccc gac	1065		
Lys Leu Ile Gly Arg Gly Gly Gly Phe Ala Arg Ile Ile Gly Pro Asp			
245	250 255 260		
ggc cgc gat ctc gca act cct ctc gcc gaa gat gag gag ggg atc ctc	1113		
Gly Arg Asp Leu Ala Thr Pro Leu Ala Glu Asp Glu Glu Gly Ile Leu			
265	270 275		
tac gcc gac atc gat ctg tct gcg atc acc ttg gcg aag cag gcc gct	1161		
Tyr Ala Asp Ile Asp Leu Ser Ala Ile Thr Leu Ala Lys Gln Ala Ala			
280	285 290		
gac ccc gtg ggc cac tac tca cgg ccg gat gtg ctg tcg ctg aac ttc	1209		
Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser Leu Asn Phe			
295	300 305		
aac cag cgc cgc acc acg ccc gtc aac acc cca ctt tcc acc atc cat	1257		
Asn Gln Arg Arg Thr Thr Pro Val Asn Thr Pro Leu Ser Thr Ile His			
310	315 320		
gcc acg cac acg ttc gtg ccg cag ttc ggg gca ctc gac ggc gtc cgt	1305		

3

Ala Thr His Thr Phe Val Pro Gln Phe Gly Ala Leu Asp Gly Val Arg  
 325 330 335 340

gag ctc aac gga gcg gac gaa cag cgc gca ttg ccc tcc aca cat tcc 1353  
 Glu Leu Asn Gly Ala Asp Glu Gln Arg Ala Leu Pro Ser Thr His Ser  
 345 350 355

gac gag acg gac cgg gcg aca gcc acc ctc tga ctcgggcgca cccgtggcgc 1406  
 Asp Glu Thr Asp Arg Ala Thr Ala Thr Leu  
 360 365

ctccgaagcg ccacgggtgt gtgaaggggc gagacagggg aatcggagga tcaccgagta 1466

caacgcatcg tcgatcg 1483

<210> 2

<211> 366

<212> PRT

<213> Rhodococcus rhodochrous

<400> 2

Met Val Glu Tyr Thr Asn Thr Phe Lys Val Ala Ala Val Gln Ala Gln  
 1 5 10 15

Pro Val Trp Phe Asp Ala Ala Lys Thr Val Asp Lys Thr Val Ser Ile  
 20 25 30

Ile Ala Glu Ala Ala Arg Asn Gly Cys Glu Leu Val Ala Phe Pro Glu  
 35 40 45

Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr His Ile Trp Val Asp Ser Pro Leu  
 50 55 60

Ala Gly Met Ala Lys Phe Ala Val Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Thr  
 65 70 75 80

Met Asp Ser Pro His Val Gln Arg Leu Leu Asp Ala Ala Arg Asp His  
 85 90 95

Asn Ile Ala Val Val Val Gly Ile Ser Glu Arg Asp Gly Gly Ser Leu  
 100 105 110

Tyr Met Thr Gln Leu Ile Ile Asp Ala Asp Gly Gln Leu Val Ala Arg  
 115 120 125

Arg Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Ser Val Tyr Gly Glu  
 130 135 140

Gly Asn Gly Ser Asp Ile Ser Val Tyr Asp Met Pro Phe Ala Arg Leu  
 145 150 155 160



Gly Ala Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Thr Leu Thr Lys Tyr Ala  
 165 170 175

Met Tyr Ser Met His Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Gly Met  
 180 185 190

Ser Leu Tyr Gln Pro Glu Val Pro Ala Phe Gly Val Asp Ala Gln Leu  
 195 200 205

Thr Ala Thr Arg Met Tyr Ala Leu Glu Gly Gln Thr Phe Val Val Cys  
 210 215 220

Thr Thr Gln Val Val Thr Pro Glu Ala His Glu Phe Phe Cys Glu Asn  
 225 230 235 240

Glu Glu Gln Arg Lys Leu Ile Gly Arg Gly Gly Gly Phe Ala Arg Ile  
 245 250 255

Ile Gly Pro Asp Gly Arg Asp Leu Ala Thr Pro Leu Ala Glu Asp Glu  
 260 265 270

Glu Gly Ile Leu Tyr Ala Asp Ile Asp Leu Ser Ala Ile Thr Leu Ala  
 275 280 285

Lys Gln Ala Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu  
 290 295 300

Ser Leu Asn Phe Asn Gln Arg Arg Thr Thr Pro Val Asn Thr Pro Leu  
 305 310 315 320

Ser Thr Ile His Ala Thr His Thr Phe Val Pro Gln Phe Gly Ala Leu  
 325 330 335

Asp Gly Val Arg Glu Leu Asn Gly Ala Asp Glu Gln Arg Ala Leu Pro  
 340 345 350

Ser Thr His Ser Asp Glu Thr Asp Arg Ala Thr Ala Thr Leu  
 355 360 365

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/02191

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N9/78 C12P41/00 C12P7/40 C12N15/70 C12N15/76  
C12N15/55

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC.

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, STRAND

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOBAYASHI M ET AL: "NITRILASE FROM RHODOCOCCUS RHODOCHROUS J1. SEQUENCING AND OVEREXPRESSION OF THE GENE AND IDENTIFICATION OF AN ESSENTIAL CYSTEINE RESIDUE" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, vol. 267, no. 29, 15 October 1992 (1992-10-15), pages 20746-20751, XP002045088 ISSN: 0021-9258	1-8
Y	siehe ganzes dokument bes. fig.2 und letzter abs. s.20750 --- -/--	9-13

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 June 2001

Date of mailing of the international search report

15/06/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mueller, F

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/02191

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 444 640 A (HIDEAKI YAMADA ;NITTO CHEMICAL INDUSTRY CO LTD (JP)) 4 September 1991 (1991-09-04) cited in the application siehe ganzes dokument besonders seite 3, ,z.25-50, , tabelle 4 und ansprüche ----	1-8
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 199524 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 1995-182072 XP002168673 & JP 07 099980 A (JAPAN ENERGY CORP), 18 April 1995 (1995-04-18) abstract ----	1-8
Y	EP 0 348 901 A (ASAHI CHEMICAL IND) 3 January 1990 (1990-01-03) cited in the application ganzes dokument, besonders tabelle 1 und seite 3, z.15- seite 5 und s. 11,12, beispiel 17 ----	9-13
P,X	WO 00 23577 A (BASF AG ;ENGELS DIRK (DE); MATTES RALF (DE); HAUER BERNHARD (DE);) 27 April 2000 (2000-04-27) the whole document -----	1-13

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/02191

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0444640	A	04-09-1991	JP 3009421 B	14-02-2000
			JP 3251192 A	08-11-1991
			CN 1055954 A, B	06-11-1991
			DE 69125877 D	05-06-1997
			DE 69125877 T	14-08-1997
			US 5135858 A	04-08-1992
<hr/>				
JP 7099980	A	18-04-1995	NONE	
<hr/>				
EP 0348901	A	03-01-1990	DE 68925002 D	18-01-1996
			DE 68925002 T	29-08-1996
			DK 314989 A	28-12-1989
			JP 2084198 A	26-03-1990
			JP 2623345 B	25-06-1997
			US 5283193 A	01-02-1994
<hr/>				
WO 0023577	A	27-04-2000	DE 19848129 A	20-04-2000
			AU 6470899 A	08-05-2000
<hr/>				

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/02191

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N9/78 C12P41/00 C12P7/40 C12N15/70 C12N15/76  
C12N15/55

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, STRAND

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	KOBAYASHI M ET AL: "NITRILASE FROM RHODOCOCCUS RHODOCHROUS J1. SEQUENCING AND OVEREXPRESSION OF THE GENE AND IDENTIFICATION OF AN ESSENTIAL CYSTEINE RESIDUE" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, Bd. 267, Nr. 29, 15. Oktober 1992 (1992-10-15), Seiten 20746-20751, XP002045088 ISSN: 0021-9258	1-8
Y	siehe ganzes dokument bes. fig.2 und letzter abs. s.20750 --- -/--	9-13

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. Juni 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

15/06/2001

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mueller, F

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 444 640 A (HIDEAKI YAMADA ;NITTO CHEMICAL INDUSTRY CO LTD (JP)) 4. September 1991 (1991-09-04) in der Anmeldung erwähnt siehe ganzes dokument besonders seite 3, z.25-50, , tabelle 4 und ansprüche ----	1-8
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 199524 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D16, AN 1995-182072 XP002168673 & JP 07 099980 A (JAPAN ENERGY CORP), 18. April 1995 (1995-04-18) Zusammenfassung ----	1-8 /
Y	EP 0 348 901 A (ASAHI CHEMICAL IND) 3. Januar 1990 (1990-01-03) in der Anmeldung erwähnt ganzes dokument, besonders tabelle 1 und seite 3, z.15- seite 5 und s. 11,12, beispiel 17 ----	9-13
P,X	WO 00 23577 A (BASF AG ;ENGELS DIRK (DE); MATTES RALF (DE); HAUER BERNHARD (DE);) 27. April 2000 (2000-04-27) das ganze Dokument -----	1-13

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/02191

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0444640 A	04-09-1991	JP 3009421 B JP 3251192 A CN 1055954 A, B DE 69125877 D DE 69125877 T US 5135858 A	14-02-2000 08-11-1991 06-11-1991 05-06-1997 14-08-1997 04-08-1992
JP 7099980 A	18-04-1995	KEINE	
EP 0348901 A	03-01-1990	DE 68925002 D DE 68925002 T DK 314989 A JP 2084198 A JP 2623345 B US 5283193 A	18-01-1996 29-08-1996 28-12-1989 26-03-1990 25-06-1997 01-02-1994
WO 0023577 A	27-04-2000	DE 19848129 A AU 6470899 A	20-04-2000 08-05-2000